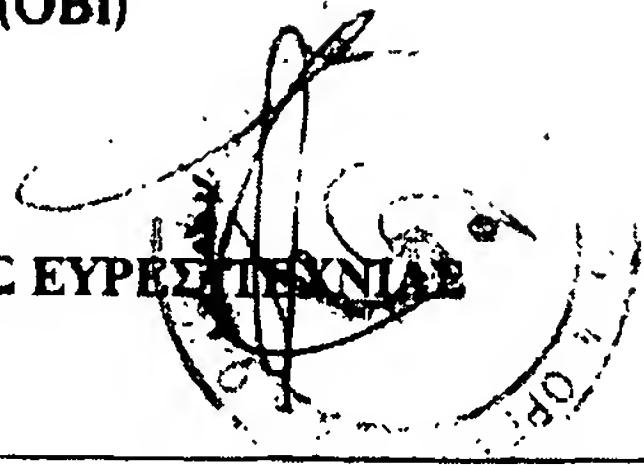




ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΣ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΗΣ ΙΔΙΟΚΤΗΣΙΑΣ (ΟΒΙ)

ΑΙΤΗΣΗ

ΓΙΑ ΚΑΤΑΘΕΣΗ ΜΕΤΑΦΡΑΣΗΣ ΕΥΡΩΠΑΪΚΟΥ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΥΡΕΣΤΙΚΗΑΣ



01 Αριθμός εγγραφής: 980402483
ετος εκδόσεως Ευρωπαϊκού Διπλώματος

02 Ημερομηνία παραλαβής:

Ημερομηνία κατάθεσης της
μεταφραστικής Ευρωπαϊκού Διπλώματος

Λογιστικός διηγοπευτής: Ε.Δ.Β.Ι.

980402483

22.10.1998

03 Αριθμός / ημερομηνία κατάθεσης 91916986.2 - 13.09.91
Ευρωπαϊκής αίτησης:

04 Αριθμός / ημερομηνία δημοσίευσης χωρίγησης 0548228 - 12.08.98
Ευρωπαϊκού Διπλώματος

Μετάφραση Ευρωπαϊκού
Διπλώματος

Μετάφραση τροποποιημένου
Ευρωπαϊκού Διπλώματος

05 ΔΙΕΘΝΗΣ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ:

C12N 9/20

06 Χώρες προσδιορισμού

AT <input checked="" type="checkbox"/> Αυστρία	ES <input checked="" type="checkbox"/> Ισπανία	IE <input type="checkbox"/> Ιρλανδία	PT <input type="checkbox"/> Πορτογαλία
BE <input checked="" type="checkbox"/> Βελγίο	FR <input checked="" type="checkbox"/> Γαλλία	IT <input checked="" type="checkbox"/> Ιταλία	SE <input checked="" type="checkbox"/> Σουηδία
LI-CH <input checked="" type="checkbox"/> Ελβετία Λιχτενστάιν	FL <input type="checkbox"/> Φιλανδία	LU <input checked="" type="checkbox"/> Λουξεμβούργο	
DE <input checked="" type="checkbox"/> Γερμανία	GB <input checked="" type="checkbox"/> Μ. Βρετανία	MC <input type="checkbox"/> Μονακό	
DK <input checked="" type="checkbox"/> Δανία	GR <input checked="" type="checkbox"/> Ελλάδα	NL <input checked="" type="checkbox"/> Ολλανδία	

07 ΠΑΡΑΛΛΑΓΕΣ ΛΙΠΑΣΗΣ.
ΤΙΤΛΟΣ

08 ΚΑΤΑΘΕΤΗΣ

NOVO NORDISK A/S

Όνομα / Επωνυμία:

NOVO ALLE, 2880 BAGSVAERD, ΔΑΝΙΑ

Διεύθυνση / Έδρα:

Τηλέφωνο:

Τέλεφαξ:

09 Επιτέλεον καταθέτεται σε πρόσθετο φύλλο χαρτιού
(Αριθμος)

ΕΦΕΥΡΕΤΗΣ (ΕΣ)

Όνομα:

SVENSEN, ALLAN

Διεύθυνση:

BAKKELEDET 28, DK-3460 BIRKEROD, ΔΑΝΙΑ

Τηλέφωνο:

Τέλεφαξ:

03 Επιτέλεον εφευρέτες σε πρόσθετο φύλο χαρτιού

(Αριθμός)

ΔΗΛΩΣΗ ΠΡΟΤΕΡΑΙΟΤΗΤΑΣ (αριθμός - ημερομηνία - χώρα προέλευσης)

219490 - 13.09.90 - ΔΑΝΙΑ
219590 - 13.09.90 - ΔΑΝΙΑ
219690 - 13.09.90 - ΔΑΝΙΑ

ΠΛΗΡΕΞΟΥΣΙΟΣ

Όνομα:

ΘΕΟΔΩΡΑ ΒΑΓΕΝΑ

Διεύθυνση:

Κουμπάρη 2, 106 74 Αθήνα

Τηλέφωνο:

3625757 - 3626624 - 3622724

Τέλεφαξ:

3626742

ΑΝΤΙΚΛΗΤΟΣ

Όνομα:

ΕΛΕΝΗ Γ. ΠΑΠΑΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΥ

Διεύθυνση:

Κουμπάρη 2, 106 74 Αθήνα

Τηλέφωνο:

3625757 - 3626624 - 3622724

3626742

Τόπος:

Αθήνα

Ημερομηνία:

21.10.98

Υπογραφή (ές) του (των) καταθέτη (τών) διονυσίου (ων)

ΒΑΓΕΝΑ - ΒΥΡΤΕΗ ΘΕΟΔΩΡΑ
ΔΙΚΗΓΟΡΙΚΗ Α.Α. 19608
ΚΟΥΜΠΑΡΗ 2 Α. Κ. Κ. Α.
ΤΗΛ: 3625757 - 3626624
ΑΦΜ: 54981583
ΔΟΥ: ΒΥΡΩΝΑ

ΘΕΟΔΩΡΑ ΒΑΓΕΝΑ

ΠΑΡΑΚΑΛΟΥΜΕ ΝΑ ΛΑΚΤΥΛΟΓΡΑΦΗΣΕΤΕ ΤΟ ΟΝΟΜΑ ΚΑΙ ΤΩΝ ΤΗΝ ΥΠΟΓΡΑΦΗ ΣΕ ΠΕΡΙΓΓΩΣΗ ΝΟΜΙΚΟΥ ΠΡΟΣΩΠΟΥ ΝΑ ΛΑΚΤΥΛΟΓΡΑΦΗΣΕΤΑΙ ΚΑΙ Η ΙΔΙΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΥΠΟΓΡΑΦΟΝΤΟΣ ΕΙΔΗΣ ΕΙΔΗΣ



ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΣ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΗΣ ΙΔΙΟΚΤΗΣΙΑΣ (ΟΒΙ)

Ε

ΑΙΤΗΣΗ

ΓΙΑ ΚΑΤΑΘΕΣΗ ΜΕΤΑΦΡΑΣΗΣ ΕΥΡΩΠΑΪΚΟΥ ΔΙΤΛΩΜΑΤΟΣ ΕΥΡΕΣΙΤΕΧΝΙΑΣ (έντυπο για επιτλέον εφευρέτες)

Αριθμός ειτησης για καταθεση μεταφράσιας Εγχωριακου Διτλώματος:	980402483	01
Ημερομηνία παραλαβής:	22.10.1998	
Ημερομηνία κατάθεσης της μεταφράσιας Εγχωριακου Διτλώματος:		
Αριθμός δημοσίευσης / Ε.Δ.Β.Ι:		

Αριθμός / ημερομηνία κατάθεσης Ευρωπαϊκής αίτησης: 91916986.2 -13.09.91	02
Αριθμός / ημερομηνία δημοσίευσης χορήγησης Ευρωπαϊκού Διτλώματος: 0548228 -12.08.98	

ΕΦΕΥΡΕΤΗΣ:	03
Όνομα / Επωνυμία: CLAUSEN, IB, GROTH	
Διεύθυνση / Έδρα: ORDRUP JAGTVEJ 153, ST.TV., DK-2920 CHARLOTTENLUND, ΔΑΝΙΑ	
Τηλέφωνο:	Τέλεφαξ:

ΕΦΕΥΡΕΤΗΣ:	04
Όνομα / Επωνυμία: PATKAR, SHAMKANT, ANANT	
Διεύθυνση / Έδρα: CHRISTOFFERS ALLE 91, DK-2800 LYNGBY, ΔΑΝΙΑ	
Τηλέφωνο:	Τέλεφαξ:

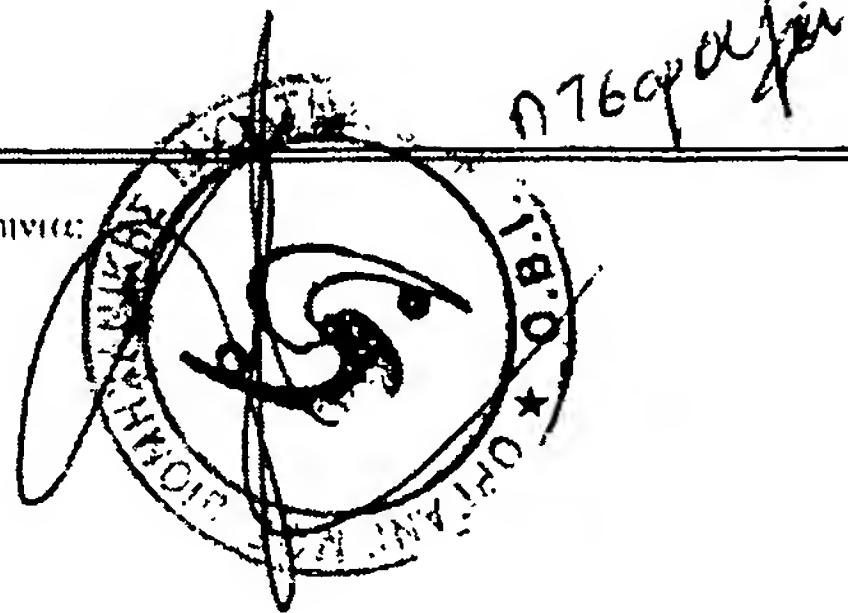
ΕΦΕΥΡΕΤΗΣ:	05
Όνομα / Επωνυμία: GORMSEN, ERIK	
Διεύθυνση / Έδρα: SNEKKETOFTEN 15, DK-2830 VIRUM, ΔΑΝΙΑ	
Τηλέφωνο:	Τέλεφαξ:

<input type="checkbox"/> Επιτλέον καταθέτες σε πρόσυντο φύλλο χαρτιού	06
(Αναθέτει)	



ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΣ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΗΣ ΙΔΙΟΚΤΗΣΙΑΣ (ΟΒΙ)

ΑΠΟΔΕΙΞΗ
ΠΑΡΑΛΑΒΗΣ ΕΓΓΡΑΦΩΝ



ΔΙΚΑΙΟΥΧΟΣ Η ΠΛΗΡΕΞΟΥΣΙΟΣ

Α.Σ.Μ. 300 300 300
Δ.Υ. 300 300 300

Ημερομηνία:



Υπογραφή / επιτημη οφελείδα

Λοιπος απομειναντες μεταφρασης
Εγραπτων Διπλωματος:

980402483

Ημερομηνία παραλαβής:

17/6/98

Ημερομηνία καταθεσης της μεταφρασης
Εγραπτων Διπλωματος:

Δραμας δημοτενος ΕΔΒΙ:

Πιστοποιούμε την παραλαβή των εγγράφων έτοι όπως δηλώνονται παρακάτω:

Η ΑΙΤΗΣΗ ΟΠΩΣ ΚΑΤΑΤΙΘΕΤΑΙ ΣΥΝΟΔΕΥΕΤΑΙ ΑΠΟ ΤΑ ΠΑΡΑΚΑΤΩ ΕΓΓΡΑΦΑ:

1. Μετάφραση της Περιγραφής 2 αντίγραφα 4 φύλλα ανά αντίγραφο

1a. Ξενόγλωσση Περιγραφή στα: Αγγλικά Γαλλικά Γερμανικά - αντίγραφα 21 φύλλα ανά αντίγραφο

2. Μετάφραση των Αξιώσεων: 2 αντίγραφα φύλλα ανά αντίγραφο

2a. Ξενόγλωσσες Αξιώσεις στα: Αγγλικά Γαλλικά Γερμανικά - αντίγραφα 2 φύλλα ανά αντίγραφο

3. Μετάφραση της Περιληψης: 2 αντίγραφα φύλλα ανά αντίγραφο

3a. Ξενόγλωσση Περιληψη στα: Αγγλικά Γαλλικά Γερμανικά - αντίγραφα 2 φύλλα ανά αντίγραφο

4. Σχέδια: 2 αντίγραφα 9 φύλλα 9 σύνολο σχεδίων

4a. Ξενόγλωσσα σχέδια: αντίγραφα 9 φύλλα 9 σύνολο σχεδίων

5. Διαφορετικές αξιώσεις για την Ελλάδα

6. Απόδειξη καταβολής τέλους κατάθεσης

7. Ειδικό πληρεξούσιο

8. Γενικό Πληρεξούσιο μηχανής μετάφραση

9. Επιτέλεον φύλλο (α) καταθέτη (ών)

10. Επιτέλεον φύλλο (α) εφευρέτη (ών)

11. Έντυπο A₁ ή A₂ ή A₃

12. Έντυπο B₁ ή B₂

13. Έντυπο 2006

14. EPO FORM 1219 ΚΑΙ ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΜΕΤΑΦΡΑΣΗ ΜΕ ΤΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΤΟΥ ΕΥΡΩΠ.
Δ.Ε.

EP.15153

ΤΙΤΛΟΣ

5

Παραλλαγές λιπάσης

Πεδίο της εφεύρεσης

10 Η παρούσια εφεύρεση αναφέρεται σε νέες παραλλαγές ενζύμιου λιπάσης με βελτιωμένες ιδιότητες, σε DNA κα-
τιασκευές που κωδικοποιούν την έκφραση των ρηθέντων παραλλαγών, σε τα κύτταρα ξενιστές ικανά να εκφρά-
ζουν τις ποικιλίες από τις DNA κατισκευές, όπως επίσης και σε μια μέθοδο παραγωγής των παραλλαγών μέσω
της καλλιέργειας των ρηθέντων ξενιστών κυττάρων.

Ιστορικό της εφεύρεσης

15 Η έλευση και η ανάπτυξη των τεχνικών ανασυνδυασμένου DNA είχε βαθιά επίδραση στο πεδίο της χημείας των
πρωτεΐνων. Θεωρείται ότι αυτές οι τεχνικές θα καταστήσουν δυνατό το σχεδιασμό πεπτιδίων και πρωτεΐνων, όπως
τα ένζυμα, σύμφωνα με ειδικά κριτήρια, επιτρέποντας έτσι την παραγωγή ενώσεων με επιθυμητές ιδιότητες.

20 Λόγω της διαθεσιμότητας τέτοιων τεχνικών, έχει καταστεί δυνατή η κατασκευή ενζύμων με επιθυμητές αλλη-
λουχίες αιμονοξέων, και πολλές έρευνες έχουν αφιερωθεί σ' αυτό το αντικείμενο.

25 Η πρωτοταγής δομής ορισμένων λιπασών έχει καθοριστεί και περιγραφεί στη βιβλιογραφία (Boel et al., *Lipids*
23, 701-706 (1988), de Caro et al., *Biochim. Biophys. Acta* 671, 129-138 (1981), Winkler et al., *Nature* 343, 771-774
(1990)). Περαιτέρω, έχει εξακριβωθεί η τριτοταγής δομή ενός πολύ μικρότερου αριθμού λιπασών (Winkler et al.,
Nature 343, 771-774 (1990), Brady et al., *Nature* 343, 767-770 (1990) J. D. Schrag et al., *Nature* 351, 1991, pp. 761-
764). Από αυτές τις έρευνες φαίνεται ότι οι λιπάσες έχουν κοινά συγκεκριμένα δομικά χαρακτηριστικά, αλλά από
την άλλη πλευρά, υπάρχουν επίσης βασικές δομικές παραλλαγές μεταξύ των λιπασών.

Σύνοψη της εφεύρεσης

30 Περαιτέρω έρευνες έχουν δείξει ότι οι βελτιωμένες ιδιότητες των λιπασών μπορούν να προκύψουν με μία ή πε-
ρισσότερες ειδικές μεταλλιγές στην αλληλούχια του DNA που εκφράζει μια ειδική λιπάση για την απόκτηση πα-
ραλλαγών λιπάσης που εμφανίζουν τέτοιες βελτιωμένες ιδιότητες.

35 Συνεπώς, από μιαν άποψη, η παρούσα εφεύρεση αναφέρεται σε μια παραλλαγή λιπάσης της γονικής λιπάσης
που περιέχει μια καταλυτική δίκην θρυψίνης τριάδα περιλαμβάνουσα μια ενεργή σερίνη κείμενη σε έννια κατ' εξο-
χήν υδροφοβία, επιμήκη θύλακα σύνδεσης των μορίου της λιπάσης, όπου το ηλεκτροστατικό φορτίο ή/και η υδρο-
φοβία της λιπιδικής ζώνης επαφής της γονικής λιπάσης αλλάζει με την εξάλειψη ή την αντικατάσταση ενός ή πε-
ρισσότερων αρνητικά φορτισμένων καταλούντων αιμονοξέων με ουδέτερο ή θετικά φορτισμένο κατάλοιπο (-α) αιμ-
νοξέων, ή/και με την αντικατάσταση ενός ή περισσότερων ουδετέρων καταλούντων αιμονοξέων με θετικά φορτισμέ-
νο κατάλοιπο (-α) αιμονοξέων, ή/και με εξάλειψη ή αντικατάσταση ενός ή περισσότερων υδροφιλων καταλοίπων
αιμονοξέων με υδρόφοβο κατάλοιπο (-α) αιμονοξέων. Προς χάριν ευκολίας, αυτή η παραλλαγή λιπάσης ορίζεται
στα ακόλουθα ως παραλλαγή λιπάσης I.

40 Στο παρόν κείμενο, ο όρος «δίκην θρυψίνης» υποδηλώνει ότι η γονική λιπάση αποτελείται από μια καταλυτική
τριάδα στο ενεργό κέντρο που αντιστοιχεί σε αυτό της θρυψίνης, π.χ. τα αιμονοξέα Ser, His και ένα από τα Asp,
Glu, Asn ή Gln. Μερικές λιπάσες μπορούν επίσης να περιλαμβάνουν μια επιφανειακή δομή βρόχου η οποία καλύ-
πτει την ενεργή σερίνη σταν η λιπάση είναι σε ανενεργή μορφή (ένα παράδειγμα μιας τέτοιας λιπάσης περιγράφε-
ται υπό Brady et al., *Nature* 343, 1990, pp. 767-770). Όταν η λιπάση ενεργοποιείται, η δομή βρόχου μεταποτίζεται
ώστε να εκθέσει τα κατάλοιπα του ενεργού κέντρου, δημιουργώντας μια επιφάνεια με αυξημένη επιφανειακή
υδροφοβία η οποία αλληλεπιδρά με το λιπιδικό υπόστρωμα στην ή κατά τη διάρκεια της υδρόλυσης. Για αυτό το
υκοπό, αυτή η επιφάνεια ορίζεται ως η «λιπιδική ζώνη επαφής», που προορίζεται να περιλαβει τα κατάλοιπα αιμ-

νοξέων πυνθανονται εντός ή σχηματίζουν μέρος της επιφάνειας. Αυτά τα κατάλοιπα μπορούν να συμμετέχουν στην αλληλεπίδραση της λιπαστής με το υπόστρωμα στην ή κατά τη διάρκεια της υδρόλυσης όπου η λιπαστή υδρολύει τριγλυκερίδια από τη λιπιδική φάση όταν ενεργοποιείται από την επαφή με την λιπιδική επιφάνεια. Κατά τη διάρκεια της υδρόλυσης των τριγλυκεριδίων, σχηματίζονται σε διάφορες ποσότητες λιπαρά οξέα και μονο- και δι-γλυκερίδια. Ένας λόγος για την αλλαγή του ηλεκτροστατικού φορτίου ή/και της υδροφοβίας της λιπιδικής ζώνης επαφής μέσω μετάλλαξης της λιπαστής σε αυτή τη ζώνη είναι ότι τα λιπαρά οξέα που σχηματίζονται κατά τη διάρκεια της υδρόλυσης μπορούν να παραμείνουν στη λιπιδική φάση. σχηματίζοντας έτσι μια αρνητικά φορτισμένη επιφάνεια. Όταν η λιπάση χρησιμοποιείται για σκοπούς πλύσης, τα αρνητικά φορτισμένα απορρυπαντικά μπορούν να σχηματίσουν αρνητικά φορτία πάνω στη λιπιδική επιφάνεια. Έτσι, με την παρασκευή των παραλλαγών λιπάσης που είναι λιγότερο αρνητικά φορτισμένες ή/και περισσότερο υδρόφοβες, είναι δυνατό να ληφθούν λιπάσες με διαφορετικές εξιδεικεύσεις ή/και βελτιωμένες ιδιότητες.

Η παρούσα εφεύρεση αναφέρεται επίσης σε μια κατασκευή DNA περιλαμβάνουσα μια αλληλουχία DNA που κωδικοποιεί μια παραλλαγή λιπάσης δύος αναιφέρθηκε παραπάνω, σε έναν ανασυνδυασμένο φορέα έκφρασης που φέρει τη ρηθείσα κατασκευή DNA, σε ένα κύτταρο μεταμορφωμένο με τη κατασκευή DNA ή τον φορέα έκφρασης, δύος επίσης σε μια μέθιδο παραγωγής μιας παραλλαγής λιπάσης της εφεύρεσης μέσω καλλιέργειας ή ανάπτυξης του ρηθέντος κυττάρου υπό συνθήκες που οδηγούν στην παραγωγή της παραλλαγής λιπάσης, μετά την οποία η παραλλαγή λιπάσης ανακτάται από την καλλιέργεια.

Η εφεύρεση αναφέρεται περαιτέρω σε ένα απορρυπαντικό πρόσθιετο περιέχον μια παραλλαγή λιπάσης της εφεύρεσης, κατ' επιλογήν με τη μορφή μιας μη κονιώδους κόκκινης, σταθεροποιημένου υγρού ή προστατευμένου ενζύμου, δύος επίσης σε μια απορρυπαντική σύνθεση περιλαμβάνουσα την παραλλαγή λιπάσης της εφεύρεσης.

Λεπτομερής περιγραφή της εφεύρεσης

Στην παρούσα περιγραφή και στις αξιώσεις, χρησιμοποιούνται οι ακόλουθες συντομογραφίες:

25 **Αμινοξέα:**

A	=	Ala	=	Αλανίνη	
V	=	Val	=	Βαλίνη	
L	=	Leu	=	Λευκίνη	
I	=	Ile	=	Ισολευκίνη	
30	P	=	Pro	=	Προλίνη
F	=	Phe	=	Φαινολαλανίνη	
W	=	Tyr	=	Τρυπιοφάνη	
M	=	Met	=	Μεθειονίνη	
G	=	Gly	=	Γλυκίνη	
35	S	=	Ser	=	Σερίνη
T	=	Thr	=	Θρεονίνη	
C	=	Cys	=	Κυστείνη	
Y	=	Tyr	=	Τυροσίνη	
N	=	Asn	=	Ασπαραγίνη	
40	Q	=	Gln	=	Γλουταμίνη
D	=	Asp	=	Ασπαρτικό οξύ	
E	=	Glu	=	Γλουταμινικό οξύ	
K	=	Lys	=	Λυσίνη	
R	=	Arg	=	Αργινίνη	
45	H	=	His	=	Ιστιδίνη

Στην περιγραφή των παραλλαγών λιπαίνης σύμφωνα με την εφεύρεται, χρησιμοποιείται η ακόλουθη ονοματολογία προς ευχολία αναφοράς:

Αρχικό αμινοξύ (-έα): Ήση (-εις): υποκατεστημένο αμινοξύ (-έα)

Σύμφωνα με αυτή την ονοματολογία, για παράδειγμα η αντικατάσταση του γλουταμινικού οξείος από γλυκίνη στη θέση 195 απεικονίζεται ως εξής:

Gly 195 Glu ή G195E

η εξάλειψη της γλυκίνης στην ίδια θέση απεικονίζεται ως:

Gly 195 * ή G195*

και η ένθεση ενός πρόσθετου κατάλοιπου αμινοξέος δημοσίευσης η λυσίνη απεικονίζεται ως:

Gly 195 GlyLys ή G195GK

Όπου η ειδική λιπάση περιλαμβάνει μια «εξάλειψη» συγχριτικά με άλλες λιπάσες και εκτελείται μια ένθεση σε μια τέτοια θέση συνδυασμένη με την θέση 36:

* 36 Asp ή *36D

για την ένθεση ενός απαρτικού οξείος στη θέση 36

Οι πολλαπλές μεταλλαγές διαχωρίζονται με συν, π.χ.:

Arg 170 Tyr + Gly 195 Glu ή R170Y + G195E

παριστάνει μεταλλαγές στις θέσεις 170 και 195 υποκαθιστώντας την τυροσίνη και το γλουταμινικό οξεύ με αργινίνη και γλυκίνη, αντίστοιχα.

Σύμφωνα με την εφεύρεται, η παραλλαγή λιπάσης I είναι κατά προτίμηση μια παραλλαγή στην οποία ένα ή περισσότερα κατάλοιπα γλουταμινικού οξείος ή απαρτικού οξείος της λιπιδικής ζώνης επιφής της λιπάσης αντικαθίστανται από γλουταμίνη, απαραγίνη, αλανίνη, λευκίνη, βαλίνη, σερίνη, θρεονίνη, λυσίνη ή αργινίνη.

Παρόλο που η γονική λιπάση μπορεί να εξαχθεί από μια ποικιλία πηγών δημοσίευσης λιπάσεων, π.χ. πειραγκρεατικές, γαστρικές, ηπατικές ή λιποπρωτεΐνικές λιπάσες, γενικώς προτιμάται να είναι μια μικροβιακή λιπάση. Ως τέτοια, η γονική λιπάση επιλέγεται από ζυμομύκητα, π.χ. λιπάσες Candida, ή βακτήριο, π.χ. λιπάσες Pseudomonas ή μύκητα, π.χ. λιπάσες Humicola ή Rhizomucor. Ιδιαίτερα προτιμάται η επιλογή της γονική λιπάσης από μια ομάδα δομικώς ομόλογων λιπασών.

Σε μια προτιμούμενη ενσωμάτωση της παραλλαγής λιπάσης I της εφεύρεσης, η γονική λιπάση είναι μια λιπάση Rhizomucor miehei, ειδικότερα η λιπάση που περιγράφεται στην EP 305 216. Σε αυτή την ενσωμάτωση, ένα ή περισσότερα κατάλοιπα αρνητικά φορτισμένων αμινοξέων μπορούν να υποκατασταθούν με ένα ή περισσότερα κατάλοιπα θετικά φορτισμένων ή ουδέτερων αμινοξέων ως ακολούθως:

D91N, K, R, A, V, L, S, T·

D256N, K, R, A, V, L, S, T·

D226N, K, R, A, V, L, S, T·

D61N, K, R, A, V, L, S, T·

D113N, K, R, A, V, L, S, T·

E201Q, K, R, A, V, L, S, T·

D243N, K, R, A, V, L, S, T.

Σε μια άλλη προτιμούμενη ενσωμάτωση της παραλλαγής λιπάσης I της εφεύρεσης, η γονική λιπάση είναι μια λιπάση Humicola lanuginosa, ειδικότερα η λιπάση που παράγεται από το στέλεχος DSM 4106 του H. lanuginosa (βλέπε EP 258 068). Σε αυτή την ενσωμάτωση, ένα ή περισσότερα αρνητικά φορτισμένα κατάλοιπα αμινοξέων μπορούν να αντικατασταθούν με ένα ή περισσότερα θετικά φορτισμένα κατάλοιπα αμινοξέων ως κάτιωθι:

45

5 E87Q, K, R, A, N, T, S, L, V.
D254N, K, R, A, Q, T, S, L, V.
D242N, K, R, A, Q, T, S, L, V.
E210Q, K, R, A, N, T, S, L, V.
E56Q, K, R, A, N, T, S, L, V.
D96N, K, R, A, Q, T, S, L, V.
D111N, K, R, A, Q, T, S, L, V.
D62A, Q, N, T, S, K, R, L, V.
E219A, Q, N, T, S, K, R, L, V.
10 E234A, Q, N, T, S, K, R, L, V.
E57A, Q, N, T, S, K, R, L, V.
E99A, Q, N, T, S, K, R, L, V.
D27A, Q, N, T, S, K, R, L, V. ή
E239A, Q, N, T, S, K, R, L, V.

15 Ιδιαίτερα προτιμούμενες αντικαταστάσεις σύμφωνα με την εφεύρεση είναι

20 E87Q + D254N + D242N + E210Q.
E87Q + D254N + E210Q.
D96N + E87Q + D254N.
R209A + E210A.

Εναλλακτικά, ένα ή περισσότερα κατάλοιπα υπόδειραν ιμανοξέων μπορεί να αντικατασταθούν με ένα ή περισσότερη θετικής φορτισμένα κατάλοιπα αμινοξέων ως κάτωθι:

25 T267K, R.
S85K, R.
T226K, R.
N88K, R.
N92K, R.
30 I255K, R.
I202K, R.
L206K, R.
L259K, R.
V203K, R. ή
35 L227K, R.

Θα πρέπει να σημειωθεί ότι η λιπάση Humicola lanuginosa και η λιπάση Rhizomucor miehei ανήκουν στην ίδια ομάδα λιπασών. Αυτό συνεπάγεται ότι η συνυλική τρισδιάστατη δομή των δύο λιπασών μοιάζει πολύ και έχει δειχθεί με κρυσταλλογραφία ακτίνων X ότι είναι τηληλί ομόλογες (ένα μοντέλο υπολογιστή της λιπάσης H. lanuginosa και της Rh. miehei απεικονίζεται στις Εικόνες 1A και B και 2A και B, αντίστοιχα, από τις οποίες οι ομοιότητες ανάμεσα στις λιπιδικές ζώνες επαφής των δύο λιπασών διακρίνονται σαφώς). Συνεπώς, είναι πιθανόν ότι οι τροποποιήσεις του υποδεικνυόμενου τύπου για κάθε λιπάση να είναι επίσης λειτουργικές για την άλλη λιπάση.

40 Θα πρέπει να σημειωθεί ότι, σύμφωνα με την εφεύρεση, οποιιδήποτε των τροποποιήσεων της αλληλουχίας των αμινοξέων που αναφέρθηκε παραπάνω για την παραλλαγή λιπάσης I μπορεί να συνδυαστεί με οποιαδήποτε άλλη τροποποιήση που αναφέρθηκε παραπάνω ή με οποιαδήποτε των τροποποιήσεων για τις παραλλαγές II και III που περιγράφονται στην WO 92/05249.

Μέθισδοι πιεριασικευτής των παρειάλιτιγών λιτάνης της εφεύρετος

Μερικές μέθισδοι για την εισαγωγή μεταλλάξεων σε γονίδια είναι γνωστές στην τεχνική. Μετά από μια σύντομη συζήτηση για την κλωνοποίηση των κινδικοποιητικών της λιτάνης DNA αλληλουχιών, (α) συζητήθουν οι μέθοδοι δημιουργίας μεταλλαγών σε ειδικές θέσεις στην αλληλουχία κινδικοποιητικής της λιτάνης.

5

Κλωνοποίηση μιας κινδικοποιητικής της λιτάνης αλληλουχίας DNA

10

Η DNA αλληλουχία που κινδικοποιεί μια γονική λιτάνη μπορεί να απομονωθεί από ένα οποιοδήποτε κύτταρο ή μικροοργανισμό που παρέχει την υπο συζήτηση λιτάνη με διάφορες μεθόδους, γνωστές στην τεχνική. Πρώτον ένα γονιδιακό DNA ή/και μια βιβλιοθήκη cDNA θα πρέπει να κατασκευαστεί χρησιμοποιώντας χρωμισωματικό DNA ή αργελιαφόρο RNA από τον οργανισμό που παράγει την υπό μελέτη λιτάνη. Ακολούθως, αν η αλληλουχία αμινοξέων της λιτάνης είναι γνωστή, μπορούν να παρασκευαστούν και να χρησιμοποιηθούν ομόλογοι επισημασμένοι ολιγονουκλεοτιδικοί ανιχνευτές στην αναγνώριση των κλώνων που κινδικοποιούν τη λιτάνη από μια βιβλιοθήκη του γονιδιώματος του βιακτηριακού DNA ή από μια βιβλιοθήκη από ένα μικητιακό cDNA. Εναλλακτικά, ένας επισημασμένος ολιγονουκλεοτιδικός ανιχνευτής που περιλαμβάνει αλληλουχίες ομόλογες της λιτάνης από άλλο στέλεχος βιακτηρίων ή μύκητων μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως ανιχνευτής για την εξακρίβωση των κλώνων που κινδικοποιούν τη λιτάνη, με τη χρήση συνθηκών υβριδοποίησης και ξεπλύματος ελειττωμένης αυστηρότητας.

15

Επιπλέον άλλη μια μέθοδος για την εξακρίβωση κλώνων που παράγουν λιτάνη περιλαμβάνει την ένθεση θραυσμάτων γονιδιακού DNA εντός ενός φορέα έκφρασης, δηλαδή, τη μεταμόρφωση βιακτηρίων εφνητικών στη λιτάνη με την προκύπτουσα βιβλιοθήκη γονιδιακού DNA, και ακολούθως την τοποθέτηση των μεταμόρφωμένων βιακτηρίων σε άγαρ που περιέχει ένα υπόστρωμα για τη λιτάνη. Αυτά τα βιακτηρία που περιέχουν πλασμίδιο που φέρει λιτάνη θα παράγουν αποικίες περιβαλλόμενες από μια άλλα διατυγούς άγαρ, λόγω της χώνευσης του υποστρώματος από την αποβαλλόμενη λιτάνη.

20

Εναλλακτικά, η DNA αλληλουχία που κινδικοποιεί το ένζυμο μπορεί να παρασκευαστεί συνθετικά με καθιερωμένες τυπικές μεθόδους, π.χ. τη φωσφοαμιδική μέθοδο που περιγράφεται υπό S. L. Beauchage and M. H. Caruthers, *Tetrahedron Letters* 22, 1981, pp. 1859-1869, ή τη μέθοδο που περιγράφεται υπό Matthes et al., *The EMBO J.* 3, 1984, pp. 801-805. Σύμφωνα με τη φωσφοαμιδική μέθοδο, τα ολιγονουκλεοτίδια παρασκευάζονται, π.χ., εντός αυτόματου παρασκευαστή DNA, και θαρρίζονται, ανασυνδέονται, συνδέονται και κλωνοποιούνται εντός κατάλληλων φορέων. Τελικώς, η DNA αλληλουχία μπορεί να είναι μικτής γονιδιακής και συνθετικής, μικτής συνθετικής και cDNA ή μικτής γονιδιακής και cDNA προέλευσης παρασκευασμένη από τη σύνδεση θραυσμάτων συνθετικής, γονιδιακής ή cDNA προέλευσης (δηλαδή συμφέρει), δηλαδή τα θραύσματα αντιστοιχούν στα διάφορα τμήματα δλης της DNA αλληλουχίας, σύμφωνα με πρότυπες τεχνικές. Η DNA αλληλουχία μπορεί επίσης να παρασκευαστεί από αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) χρησιμοποιώντας ειδικούς εκχινητές, για παράδειγμα δηλαδή περιγράφεται στην US 4.683.202 ή υπό R. K. Saiki et al., *Science* 239, 1988, pp. 487-491.

25

Μεταλλαξιγένεση κατευθυνόμενης θέσης της αλληλουχίας που κινδικοποιεί τη λιτάνη

30

Όταν απομονωθεί η DNA αλληλουχία που κινδικοποιεί τη λιτάνη, και έχουν εξακριβωθεί οι επιθυμητές θέσεις για τη μεταλλαγή, οι μεταλλαγές μπορούν να εισαχθούν με τη χρήση συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων. Αυτά τα ολιγονουκλεοτίδια περιέχουν αλληλουχίες νουκλεοτιδίων που στέκονται δίπλα στις επιθυμητές θέσεις μεταλλαγής. Τα μεταλλαγμένα νουκλεοτίδια εισάγονται κατά τη διάρκεια της ολιγονουκλεοτιδικής σύνθετης. Σε μια ειδική μέθοδο, ένα μονόκλωνο χάσμα του DNA που γεφυρώνει την αλληλουχία που κινδικοποιεί τη λιτάνη, δημιουργείται εντός ενός φορέα που φέρει το γονίδιο λιτάνης. Ακολούθως το συνθετικό νουκλεοτίδιο, που φέρει την επιθυμητή μεταλλαγή, ανασυνδέεται σε μια ομόλογη περιοχή του μονόκλωνου DNA. Το παραμένον χάσμα ακολουθεί πληρούται με DNA πολυμεράση I (θραύσμα Klenow) και η δομή συνδέεται με τη χρήση λιγκάσης T4. Σε ένα ειδικό παράδειγμα αυτής της μεθόδου περιγράφεται υπό Morinaga et al., (1984, *Biotechnology* 2: 646-639). Στην Ευρ. ΗΠΑ Νο. 4.760.025 υπό Estell et al., που δημοσιεύτηκε στις 26 Ιουλίου 1988, περιγράφεται η εισαγωγή ολιγονουκλεοτιδίων που κινδικοποιούν πολλαπλές μεταλλαγές μέσω πραγματοποίησης ελέχιστων τροποποιήσεων της καισ-

σέτις, εντούτοις, μπορεί να εισαχθεί μιαι αικόνη μεγαλύτερη ποικιλία μεταύλαγνη σε ωποιοδήποτε χρόνο με τη μέθοδο Morinaga, επειδή μπορεί να εισαχθεί μια πολλαπλότητα ολιγονουκλεοτιδίων με διαφορετικά μήκη.

Μια άλλη μέθοδος εισαγωγής μεταλλαγών σε αλληλουχίες που κωδικοποιούν τη λιπάση περιγράφεται υπό Nelson and Long, Analytical Biochemistry 180, 1989, pp. 147-151. Αυτή περιλαμβάνει την εκ τριών σταδίων δημιουργία ενός θραύσματος PCR που περιέχει την επιθυμητή μεταλλιγή που εισάγεται με τη χρήση ενός χημικά παρασκευασμένου κλάνου DNA ως ένα από τους εκκινητές στις αντιδράσεις PCR. Από το από την PCR δημιουργούμενο θραύσμα, μπορεί να απομονωθεί ένα θραύσμα DNA περιέχον τη μεταύλαγη μέσω διάσπασης με ενδονουκλεάσεις περιορισμού και την επανένθεση σε ένα πλασμίδιο έκφρασης (βλέπε επίσης τις Εικ. 3 και 4 στις οποίες απεικονίζεται περαιτέρω αυτή η μέθοδος).

10

Έκφραση των παραλλαγών λιπάσης

Σύμφωνα με την παρούσα εφεύρεση, μια μεταλλιγμένη αλληλουχία που κωδικοποιεί τη λιπάση που παράγεται με τις ανωτέρω περιγραφέισες μεθόδους, ή με οποιαδήποτε εναλλακτική μέθοδο γνωστή στην τεχνική, μπορεί να εκφραστεί σε ενζυμική μορφή, με τη χρήση ενός φορέα έκφρασης ο οποίος τυπικά περιλαμβάνει αλληλουχίες ελέγχου που κωδικούν έναν προαγωγέα, έναν χειριστή, τη ριθοσωμική θέση δέσμευσης, τη μετάφραση του σήματος έναρξης, και κατ' επιλογήν ένα γονιδιακό καταστόλεα ή διάφορους γονιδιακούς ενεργοποιητές. Για να επιτραπεί η απέκκριση της εκφραζόμενης πρωτεΐνης, τα νουκλεοτίδια που κωδικοποιούν ένα «σήμα αλληλουχίας» μπορούν να εισαχθούν πριν την αλληλουχία που κωδικοποιεί τη λιπάση. Για την έκφραση υπό τη φορά των αλληλουχίων ελέγχου, ένα γονίδιο στόχος προς επεξεργασία σύμφωνα με την εφεύρεση συνδέεται λειτουργικά με τις αλληλουχίες ελέγχου στο κατάλληλο πλαίσιο ανάγνωσης. Οι αλληλουχίες του προαγωγέα που μπορούν να ενσωματωθούν στους πλασμιδικούς φορείς, και οι οποίες μπορούν να στηρίζουν τη μεταγραφή του μεταλλιγμένου γονιδίου λιπάσης, περιλαμβάνουν χωρίς περιορισμό τον προκαρυωτικό προσαγωγέαβ-λακταμάσης (Villa-Kamaroff, et al., 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 3727-3731) και τον προαγωγέα lac (DeBoer, et al., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 21-25). Περαιτέρω αναφορές μπορούν επίσης να βρεθούν στο «Useful proteins from recombinant bacteria» στο Scientific American, 1980, 242: 74-94.

25

Σύμφωνα με μια ενσωμάτωση ο *B. subtilis* μεταμορφώνεται από έναν φορέα έκφρασης που φέρει το μεταλλιγμένο DNA. Αν η έκφραση πρόκειται να λάβει χώρα σε έναν απεκκριτικό μικροοργανισμό δύπως ο *B. subtilis* μια αλληλουχία σήματος μπορεί να ακολουθήσει τη μετάφραση του σήματος έναρξης και προηγείται της DNA αλληλουχίας που μας ενδιαφέρει. Η αλληλουχία σήματος δροι για τη μεταφορά του προϊόντος έκφρασης στο κυτταρικό τοξικό διασπάται από το προϊόντος κατά την απέκκριση. Ο δρος «αλληλουχίες ελέγχου» δύπως ορίζονται ανωτέρω περιλαμβάνουν μια αλληλουχία σήματος, δταν είναι παραπούσα.

30

Στην παρούσα προτιμούμενη μέθοδο παραγωγής παραλλαγών λιπάσης της εφεύρεσης, ως ξενιστής οργανισμός χρησιμοποιείται ένας νηματόδης μύκητας. Ο ξενιστής οργανισμός νηματόδης μύκητας μτυχεί προσφέρων να είναι ένας μύκητας που έχει χρησιμοποιηθεί προηγουμένως ως ξενιστής προς παραγωγή ανασυνδυασμένων πρωτεΐνων, π.χ. ένα στέλεχος του *Aspergillus* sp., δύπως *A. niger*, *A. nidulans* ή *A. oryzae*. Η χρήση του *A. oryzae* στην παραγωγή των ανασυνδυασμένων πρωτεΐνων περιγράφεται εκτενώς, π.χ. στην EP 238 023.

35

Για την έκφραση των παραλλαγών λιπάσης στον *Aspergillus*, ένας προσαγωγέας προηγείται της DNA αλληλουχίας που κωδικοποιεί την παραλλαγή λιπάσης. Ο προσαγωγέας μπορεί να είναι οποιαδήποτε αλληλουχία DNA που εμφανίζει μια ισχυρή μεταγραφική δραστικότητα στον *Aspergillus* και μπορεί να εξισχθεί από ένα γονίδιο που κωδικοποιεί μια εξωκυτταρική ή επωκυτταρική πρωτεΐνη δτως μια αιμολάση, μια γλυκοαμυλάση, μια πρωτεάση, μια λιπάση, μια κυτταρινάση ή ένα γλυκολυστικό ένζυμο.

40

Παραδείγματα κατάλληλων προσαγωγών είναι οι εξαγόμενοι από το γονίδιο που κωδικοποιεί την αιμολάση TAKA *A. oryzae*, *Rhizomucor miehei* ασπαρτική πρωτεΐνα, *A. niger* συδέτερη α-αμυλάση, *A. niger* σταθερή σε οξεία α-αμυλάση, *A. niger* γλυκοαμυλάση, *Rhizomucor miehei* λιπάση, *A. oryzae* αλκαλική πρωτεάση ή *A. oryzae* ιωμεράση φωσφορικής τριδύνης.

45

Ειδικότερα δταν ο ξενιστής οργανισμός είναι ο *A. oryzae*, ένας προτιμούμενος προσαγωγέας για χρήση στη μέθοδο της παρούσας εφεύρεσης είναι ο προσαγωγέας αιμολάση *A. oryzae* TAKA καθώς εμφανίζει μια ισχυρή μετα-

γραφική δραστικότητας στον A. oryzae. Η αλληλουχία του προιγωγέται της αιμολιωτής ΤΑΚΑ περιγράφεται στην EP 238 023.

Οι αλληλουχίες τερματισμού και πολυειδενυλίωσης μπορούν κατάλληλα να εξαχθούν από τις ίδιες πηγές δπως του προιγωγέα.

5 Οι τεχνικές που χρησιμοποιούνται για τη μεταμόρφωση ενός ξενιστή κυττάρου μύκητα μπορούν να είναι καταλήλως όπως περιγράφονται στην EP 238 023.

Για τη διασφάλιση της απέκκρισης της παραλλαγής λιτάνης από το κύτταρο ξενιστή, έναι σήμα αλληλουχίας προηγείται της DNA αλληλουχίας που κωδικοποιεί την παραλλαγή της λιτάνης το οποίο μπορεί να είναι ένα φυσικός απαντώμενο σήμα αλληλουχίας ή ένα δραστικό τμήμα αυτού ή μια συνθετική αλληλουχία παρέχουσα έκφραση της πρωτεΐνης από το κύτταρο. Ειδικότερα, η αλληλουχία σήματος μπορεί να προέρχεται από ένα γονίδιο που κωδικοποιεί μια αιμολάση ή γλυκοαμυλάση Aspergillus sp, έναι γονίδιο που κωδικοποιεί μια λιπάση ή πρωτεΐνη Rhizomucor miehei, ή ένα γονίδιο που κωδικοποιεί μια κυτταρινάση ξυλανάση ή λιπάση Humicola. Η αλληλουχία σήματος κατά προτίμηση εξάγεται από ένα γονίδιο που κωδικοποιεί την αιμολάση ΤΑΚΑ A. oryzae, την συδέτεση α-αιμολάση A. niger, την σταθερή σε οξέα α-αιμολάση A. niger ή την γλυκοαμυλάση A. niger.

10 15 Το μέσο που χρησιμοποιείται για την καλλιέργεια των μεταμόρφωμάν των κυττάρων ξενιστών μπορεί να είναι οποιοδήποτε συμβατικό μέσο κατάλληλο για την ανάπτυξη των κυττάρων Aspergillus. Οι μεταμόρφωμένοι τύποι είναι συνήθως σταθεροί και μπορούν να καλλιεγηθούν αποτελεσματικά επιλεκτικής πίεσης. Εντούτοις, αν οι μεταμόρφωμένοι τύποι βρεθούν ότι είναι ασταθείς, έναις εισαγόμενος δείκτης επιλογής στις κύτταρες μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την επιλογή.

20 25 Η απεκκρινόμενη πρωτεΐνη ώριμης λιπάσης από τα κύτταρα ξενιστές μπορεί προσφέρωνται να ανακτηθεί από το μέσο καλλιέργειας με γνωστές μεθόδους που περιλαμβάνουν το διαχωρισμό των κυττάρων από το μέσο μέσω φυγοκέντρησης ή διήθησης, και την καταχρήμνιση των πρωτεΐνικών συστατικών του μέσου με ένα άλας δπως θεικό αιμούνιο, με ακόλουθες χρωματογραφικές μεθόδους όπως ιωνοανταλλακτική χρωματογραφία, χρωματογραφία συγγένειας και τις παρόμοιες.

30 35 Η παρούσα εφεύρεση αναφέρεται επίσης σε ένα απορρυπαντικό πρόσθιετο που περιλαμβάνει μια παραλλαγή λιπάσης σύμφωνα με την εφεύρεση, κατά προτίμηση με τη μορφή μη κονιώδους κόκκου, σταθεροποιημένου υγρού ή προστατευμένου ενζύμου. Οι μη κονιώδεις κόκκοι μπορούν να παραχθούν π.χ. σύμφωνα με τις EP. ΗΠΑ 4.106.991 και 4.661.452 (αμφότερες της Novo Industry A/S) και μπορούν κατ' επιλογήν να επικαλυφθούν με μεθόδους γνωστές στην τεχνική. Τα υγρά ενζυμικά παραπενάσματα μπορούν, π.χ., να σταθεροποιηθούν με την προσθήκη μιας πολυσόλης δπως προπολενογλυκόλη, ενός σαχχάρου ή σαχχαροαλκοόλης, λακτικού οξέος ή βιορικού οξέος σύμφωνα με καμιερωμένες μεθόδους. Άλλοι ενζυμικοί σταθεροποιητές είναι γνωστοί στην τεχνική. Τα προστατευμένα ένζυμα μπορούν να παρασκευαστούν σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφεται στην EP 238 216.

40 45 Το απορρυπαντικό πρόσθιετο μπορεί καταλλήλως να περιέχει από 0,02-200 χλωτγρ. ενζυμική πρωτεΐνη ανά γραμμάριο πρόσθιετο. Θα καταστεί κατανοητό ότι το απορρυπαντικό πρόσθιετο μπορεί περιπτέρω να περιλαμβάνει ένα ή περισσότερα άλλα ένζυμα, δπως μια πρωτεΐνη, κυτταρινάση, υπεροξειδάση ή αιμολάση, περιλαμβανομένων προσφόρων σε απορρυπαντικά πρόσθιετα.

Κατά μιαν ακόμα περιπτέρω αποψη, η εφεύρεση αναφέρεται σε μια απορρυπαντική σύνθεση περιέχουσα μια παραλλαγή λιπάσης της εφεύρεσης. Οι απορρυπαντικές συνθέσεις της εφεύρεσης επιπροσθέτως περιέχουν επιφανειοδραστικά τα οποία μπορούν να είναι ανιοντικού, μη ιονικού, καπιοντικού επαμφοτεριζόντος ή σβιττεριωνικού τύπου δπως επίσης ως μέγιματα αυτών των επιφανειοδραστικών κλάσεων. Τυπικά παραδείγματα κατάλληλων επιφανειοδραστικών είναι γραμμικά βενζολοσουλφονικά αλκυλία (LAS), άλφα ολεφινοσουλφονικά (AOS), αλκοολοιοιζυμικά (AEOS), αλκοολουαιοιζυλικά (AEO), αλκυλοιοιζεικά (AS), αλκυλοπολυγλυκοζίτες (APG) και άλλα αλκαλιμετάλων με φυσικά λιπαρά οξέα.

45 Οι απορρυπαντικές συνθέσεις της εφεύρεσης μπορούν να περιέχουν άλλα απορρυπαντικά συστατικά γνωστά στην τεχνική δπως π.χ. σώματα απορρυπαντικών, λευκαντικά, ενεργοποιητές λεύκανσης, αντιδιαβολικά, μέσα διαχωρισμού, μέσα αντι-επαναπόθεσης ρύπων, αρώματα, σταθεροποιητές ενζύμου κ.λπ.

5 Η απορρυπαντική σύνθετη πηγή εφεύρεται να μορφωτούμενη σε οποιαδήποτε πρόσαφυρη μορφή, π.χ. ως σκόνη ή υγρό. Το ένζυμο μπορεί να υποθερμοποιηθεί σε ένα υγρό απορρυπαντικό μέσω έγκλεισης των σταύλεροποιητών ενζυμών όπως αναφέρθηκε παραπάνω. Συνήθως, το πεχί ενδέ διαλύματος της απορρυπαντικής σύνθεσης πηγής εφεύρεται θα είναι 7-12 και σε μερικές περιπτώσεις 7-10.5. Άλλα ενζυμακά απορρυπαντικά όπως πρωτεΐνες, κυτταρινάσες, υπεροξειδάσες ή αιμολάπες μπορεί να περιέχονται στις απορρυπαντικές συνθέσεις της εφεύρεται, είτε ξεχωριστά είτε σε ένα συνδυασμένο πρόσθετο όπως περιγράφηκε παραπάνω.

Σύντομη περιγραφή των σχεδίων

10 Η παρούσα εφεύρεση περιγράφεται ακολούθως με αναφορά στα συναπόδεινα σχέδια, στα οποία οι Εικόνες 1A και B είναι μοντέλα σχεδιασμένα στον ηλεκτρονικό υπολογιστή και απεικονίζουν μια τρισδιάστατη δομή της λιπιδικής ζώνης επαφής της λιπάσης *H. lanuginosa* σταν η λιπάση είναι σε ανενεργή (A) και ενεργή (B) μορφή, αντίστοιχα. Τα «λειπά» κατάλοιπα παριστάνουν υδρόφοβα αιμονοξέα (Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Trp, Gly, και Met), τα «κίτρινα» παριστάνουν υδρόφιλα αιμονοξέα (Thr, Ser, Glu, Asn, Tyr και Cys), τα «μπλε» παριστάνουν θετικά φορτισμένα αιμονοξέα (Lys, Arg και His), και τα «ερυθρά» παριστάνουν αρνητικά φορτισμένα αιμονοξέα (Glu και Asp).

15 Οι Εικόνες 2A και 2B είναι μοντέλα υπολογιστή και απεικονίζουν μια τρισδιάστατη δομή της λιπιδικής ζώνης επαφής της λιπάσης *Rh. miehei* σταν η λιπάση είναι σε ανενεργή (A) και ενεργή (B) μορφή, αντίστοιχα. Τα «λευκά» κατάλοιπα παριστάνουν υδρόφοβα αιμονοξέα (Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Trp, Gly, και Met), τα «κίτρινα» παριστάνουν υδρόφιλα αιμονοξέα (Thr, Ser, Glu, Asn, Tyr και Cys), τα «μπλε» παριστάνουν θετικά φορτισμένα αιμονοξέα (Lys, Arg και His), και τα «ερυθρά» παριστάνουν αρνητικά φορτισμένα αιμονοξέα (Glu και Asp).

20 Η Εικ. 3 είναι μια σχηματική παράσταση της παρασκευής των πλασμάδων που χαρικοποιούν παραλλαγές λιπάσης μέσω της αλυσιδωτής αντιδραστηρικής πολυμεράσης (PCR).

Η Εικ. 4 είναι μια σχηματική παράσταση της τριών σταδίων μεταλλαξιγένεσης μέσω PCR.

25 Η Εικ. 5 απεικονίζει ένα χάρτη περιορισμού των πλασμάδων pAO1.

Η Εικ. 6 απεικονίζει ένα χάρτη περιορισμού των πλασμάδων pAHL· και

25 Η Εικ. 7 απεικονίζει ένα χάρτη περιορισμού των πλασμάδων pARML.

Η παρούσα εφεύρεση περαιτέρω απεικονίζεται στα ακόλουθα παραδείγματα την οποία με κανένα τρόπο δεν περιορίζουν το σκοπό της εφεύρεσης ως αξιώνεται.

30 Γενικές μέθοδοι

Έκφραση της λιπάσης *Humicola lanuginosa* και της λιπάσης *Rhizomucor miehei* στον *Aspergillus oryzae*:

35 Η κλωνοποίηση της λιπάσης *Humicola lanuginosa* και της λιπάσης *Rhizomucor miehei* περιγράφεται στην EP 305,216 και EP 238 023, αντίστοιχα. Αυτές οι εφαρμογές εφεύρεσεν επίσης περιγράφουν την έκφραση και το χαρακτηρισμό των δύο λιπασών στον *Aspergillus oryzae*. Τα δύο πλασμάδια έκφρασης που χρησιμοποιούνται ορίζονται ως p960 (που φέρει το γονίδιο λιπάσης *H. lanuginosa*) και p787 (που φέρει το γονίδιο λιπάσης *R. miehei*).

40 Τα πλασμάδια έκφρασης που χρησιμοποιούνται σε αυτή την εφαρμογή είναι αταράλλακτα με τα p787 και p960, εκτός από ελάχιστες τροποποιήσεις αμέσως στο 3' στις περιοχές κωδικοποίησης της λιπάσης. Οι τροποποιήσεις εκτελέστηκαν με τον ακόλουθο τρόπο: το p960 χωνεύτηκε με τα περιοριστικά ένζυμα NruI και BamHI. Ανάμεσα σε αυτές τις δύο θέσεις το θραύσμα BamHI/NheI από το πλασμάδιο pBR322, στο οποίο το θραύσμα NheI πληρώθηκε με πολυμεράση Klenow, κλωνοποιήθηκε, και έτσι δημιουργήθηκε το πλασμάδιο pAO1 (Εικ. 5) το οποίο περιέχει τις μοναδικές θέσεις BamHI και NheI. Ανάμεσα σε αυτές τις μοναδικές θέσεις τα θραύσματα BamHI/XbaI από τα p960 και p787 κλωνοποιήθηκαν παρέχοντας το pAHL (Εικ. 6) και pARML (Εικ. 7), αντίστοιχα.

Μεταλλαξιγένειη κατευθυνόμενης θέσης *in vitro* των γονιδίων λιτάσης:

Για την εισαγωγή μεταλλαγών στα γονίδια λιτάσης χρησιμοποιήθηκαν τρεις διαφορετικές προσεγγίσεις.

Μια μέθοδος που εφαρμόστηκε ήταν η κατευθυνόμενης θέσης μεταλλαξιγένειη ολιγονουκλεοτιδίου η οποία περιγράφεται υπό Zoller & Smith, DNA, Vol. 3, No. 6, 479-488 (1984). Η μέθοδος περιγράφεται εν ποντικία ακολούθως, και περιγράφεται πλήρως στο Παράδειγμα 1.

Το γονίδιο λιτάσης, απόμονωμένο από το πλασμίδιο έκφρασης, εισάγεται σε ένα κυκλικό βακτηριαφάγο φορέα M13. Σε ένα μονόκλωνο γονιδίωμα, ανασυνδέεται ένπις χημικά παρασκευισμένος συμπληρωματικός κλάνος DNA. Αυτός ο κλάνος DNA περιέχει την προς ένθεση μεταλλαγή ανάμεσα σε αλληλουχίες συμπληρωματικές στις αλληλουχίες λιτάσης στο κυκλικό DNA. Ο εκκινητής (έναιμα) ακολουθώς εκτείνεται *in vitro* σε ολόκληρο το μήκος του κυκλικού γονιδιώματος βιοχημικά με τη χρήση πολυμεράστης Klenow. Όταν μεταμορφωθεί στην *E. coli*, το ετερόδιπλο θα δημιουργήσει το δίκλωνο DNA με την επιθυμητή αλληλουχία από την οποία μπορεί να απομονωθεί ένα θραύσμα και να επανεισαχθεί εντός του πλασμιδίου έκφρασης.

Μια άλλη μέθοδος που εφαρμόστηκε περιγράφεται υπό Nelson & Long, Analytical Biochemistry, 180, 147-151 (1989). Αυτή περιλαμβάνει την δημιουργία σε 3 στάδια ενός θραύσματος PCR (αλυσιδωτή αντιδραση πολυμεράστης) που περιέχει την επιθυμητή μεταλλαγή που εισάγεται με τη χρήση χημικά παρασκευασμένου κλάνου DNA ως ένα από τους εκκινητές στις αντιδράσεις PCR. Από το δημιουργηθέν μέσω PCR θραύσμα, μπορεί να απομονωθεί μέσω διάσχισης με περιοριστικά ένζυμα ένα θραύσμα DNA που φέρει μια μεταλλαγή και επανεισάγεται στο πλασμίδιο έκφρασης. Αυτή η μέθοδος περιγράφεται πλήρως στο Παράδειγμα 3. Η μέθοδος περαιτέρω απεικονίζεται στις Εικόνες 3 και 4.

Σε μια περαιτέρω μέθοδο, που συνήθως ορίζεται «μεταλλαξιγένειη κασέτις», αντικαθίσταται ένα τμήμα μεταξύ δύο θέσεων περιορισμού της περιοχής που κωδικοποιεί τη λιτάση μέσω ενός συνθετικού θραύσματος DNA που φέρει την επιθυμητή μεταλλαγή.

Παράδειγμα 1:

Κατασκευή ενός πλασμίδου που εκφράζει την παραλλαγή D96L της λιτάσης *Humicola lanuginosa*

Απομόνωση του γονιδίου λιτάσης:

Το πλασμίδιο έκφρασης p960 περιλαμβάνει την κωδικοποιητική περιοχή για τη λιτάση *Humicola lanuginosa* σε ένα θραύσμα περιορισμού *Bam*HI/*Xba*I (το DNA και η αλληλουχία αμινοξέων της λιτάσης απεικονίζονται στην Καταχώρηση Αλληλουχίας ID No. 1). Το θραύσμα *Bam*HI/*Xba*I απόμονώθηκε ως ακολουθώς: το πλασμίδιο έκφρασης επωάστηκε με τις ενδονουκλεάσες περιορισμού *Bam*HI και *Xba*I. Οι συνθήκες ήταν: 5 μ.γρ. πλασμιδίου, 10 μονάδες *Bam*HI, 10 μονάδες *Xba*I, 100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, πεχά 7.5, 10 mM MgCl₂ και 1 mM DTT σε δύκο 50 μ.λτ. Η θερμοκρασία ήταν 37 °C και ο χρόνος αντίδρασης 2 ώρες. Τα δύο θραύσματα διατηρήθηκαν σε πηκτή αγαρός 1% και το επιθυμητό θραύσμα απομονώθηκε από την πηκτή.

Σύνδεση με το φορέα M13mp18:

Χωνεύτηκε ο βακτηριοφάγος φορέας M13mp18 στη δίκλωνη αντιγραφική μορφή αυτού με *Bam*HI και *Xba*I υπό τις ανωτέρω συνθήκες. Το απομονωθέν θραύσμα περιορισμού συνδέθηκε στο χωνευμένο βακτηριοφάγο φορέα στο ακόλουθο μίγμα αντίδρασης: Θραύσμα 0.2 μ.γρ., φορέας 0.02 μ.γρ., 50 mM Tris-HCl, πεχά 7.4, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT και 1 mM ATP σε δύκο 20 μ.λτ. στους 16 °C επί 3 ώρες. Μεταμορφώθηκεν 5 μ.λτ. αυτού του μίγματος στο στελέχος JM101 της *E. coli*. Η παρουσία του θραύσματος εντός του φορέα εξακριβώθηκε με τινάλυση περιοριστικού ενζύμου στο απομονωθέν δίκλωνο M13-DNA από τους μεταμορφωμένους τύπους.

Απομόνωση του μονόκλωνου (ss) DNA (μήτρα):

Από τους μεταμορφωμένους τύπους που περιγράφηκαν παραπάνω, απομονώθηκε το ss-DNA σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφηκε υπό Messing στο Gene, 19, 269-276 (1982).

5' φυσικού μυελίωση του εκκινητή μεταλλαξιγένεισης:

Φωσφορυλιώθηκε ο εκκινητής μεταλλαξιγένεισης με την αλληλουχία 5'-TTTCTTTCAACAAAGAAGTTAAGA-3' στο τέλος της 5' εντός μίγματος αντίδρασης 30 μλτ. περιέχοντος 70 mM Tris-HCl, πεχά 7, 10 mM MgCl₂, 5 mM DTT και 1 mM ATP, 100 pMοl ολιγονουκλεοτίδιου και 3,6 μονάδες πολυνουκλεοτίδιου κινάσης T4. Η αντίδραση εκτελέστηκε επί 30 λεπτά στους 37°C. Ακολούθως, το ένζυμο αδρανοποιήθηκε με επώπιση του μίγματος επί 10 λεπτά στους 65°C.

Ανασύνδεση της μήτρας και φωσφορυλωμένου εκκινητή μεταλλαξιγένεισης:

Η ανασύνδεση της μήτρας και του εκκινητή εκτελέστηκε εντός δγκου 10 μ.λτ. περιέχοντος 0,5 pMοl μήτρας, 5 pMοl εκκινητή, 20 mM Tris-HCl, πεχά 7,5, 10 mM MgCl₂, 50 mM NaCl και 1 mM DTT με θέρμανση επί 10 λεπτά στους 65°C και ακόλουθη ψύξη στους 0°C.

Αντίδραση επέκτασης/πύνδεσης:

Στο ανωτέρω μίγμα αντίδρασης, προστέθηκαν 10 μλτ. του ακόλουθου μίγματος: 0,3 mM dATP, 0,3 mM dCTP, 15 0,3 mM dGTP, 0,3 mM TTP, 1 mM ATP, 20 mM Tris-HCl, πεχά 7,5, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 3 μονάδες λιγκάσης T4 DNA και 2,5 μονάδες πολυμεράσης Klenow. Ακολούθως, η αντίδραση εκτελέστηκε επί 16 ώρες στους 16°C.

Μεταμβοφωση του JM101:

Το ανωτέρω μίγμα αντίδρασης μεταμορφώθηκε σε διάφορες αραιώσεις εντός κατεργασμένων με CaCl₂ κυττάρων JM101 της E.coli με τη χρήση πρότυπων τεχνικών και καλλιεργήθηκαν σε άνω πλάκες άγαρ 2 x YT σε πλάκες άγαρ 2 x YT (2 x YT = τρυπτόνη 16 γρ.Λτ., εκχύλισμα ζυμομύκητα 10 γρ.Λτ., NaCl 5 γρ.Λτ. Προστέθηκε 2 x YT άνω άγαρ = 2 x YT με αγαρόδη 0,4% και φέρθηκε σε αυτόκλειστο. Προστέθηκαν πλάκες άγαρ 2 x YT = 2 x YT με άγαρ 2% και φέρθηκαν σε αυτόκλειστο).

25 Οι πλάκες επωάστηκαν ολονυκτίως στους 37°C.

Εξακρίβωση των θετικών κλώνων:

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε ήταν υβριδοποίηση σε κεκλιμένη πλάκα η οποία περιγράφεται ως ακολούθως: Φέρθηκε ένας ηθμός νιτροκυτταρίνης σε μια πλάκα με κατάλληλη πυκνότητα πλάκας, έτσι ώστε να διαβρέχεται ο ηθμός. Ακολούθως ο ηθμός φέρθηκε σε λουτρό στα ακόλουθα διαλύματα: 1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH επί 30 δευτερόλεπτα, 1,5 M NaCl, 0,5 M Tris-HCl, πεχά 8 επί 1 λεπτό και 2 x SSC (0,3 M NaCl, 0,03 M κιτρικό νάτριο) για μεταγενέστερη χρήση. Ο ηθμός ξηράνθηκε σε διηθητικό χαρτί 3 MM και ψήθηκε επί 2 ώρες στους 80°C σε φούνο κενού.

35 Ο εκκινητής μεταλλαξιγένεισης με την αλληλουχία 5'-TTTCTTTCAACAAAGAAGTTAAGA-3' ραδιοιστριάνθηκε στο 5' άκρο εντός δγκου 30 μλτ. περιέχοντος 70 mM Tris-HCl, πεχά 7,5, 10 mM MgCl₂, 5 mM DTT, 10 pM ολιγονουκλεοτίδιο, 20 pM γ-32P-ATP και 3,5 μονάδες πολυνουκλεοτίδιο κινάσης T4. Το μίγμα επωάστηκε στους 37°C επί 30 λεπτά και ακολούθως επί 5 λεπτά στους 100°C.

40 Ο ξηρανθείς ηθμός υβριδώθηκε προκαταρτικά επί 2 ώρες στους 65°C σε 6 x SSC, 0,2% βρεια οροσαλβουμίνη, 0,2% Ficoll, 0,2% πολυβινιλοπυρολιδόνη, 0,2% δωδεκαλιθεικό νάτριο (SDS) και 50 μγρ.χλοτέτ. DNA σπέρμιατος σιλωμού κατεργασμένο με υπερήχους. Ακολούθως, το περιέχον το οπημασμένο ανιχνευτή μίγμα αντίδρασης προστέθηκε σε 15 χλοτέτ. Φρέσκου μίγματος προκαταρκτικής υβρίδωσης, και ο ηθμός φέρθηκε εντός αυτού ολονυκτίως στους 27°C με ήπια ανακίνηση. Μετά την υβρίδωση, ο ηθμός ξεπλύθηκε 3 φορές κάθε φορά επί 15 λεπτά σε 2 x SSC, 0,1% SDS και αυτοραδιογραφήθηκε. Μετά το ξέπλυμα στο ίδιο διάλυμα, αλλά τώρα στους 50°C, και με όλη αυτοραδιογραφία, εξακριβώθηκαν οι πλάκες οι περιέχουσες αλληλουχίες DNA συμπληρωματικές του εκκινητή μεταλλαξιγένεισης.

45 Επειδή ο εξακριβωμένος κλώνος είναι αποτέλεσμα ενός ετερόδιπλου, η πλάκα καλλιεργήθηκε πάλι. Επαναλήφθηκαν τα στάδια υβρίδωσης και εξακρίβωσης.

(ισοχρονικά με Tris-HCl, πεχά 7,5) και κατακρημνώντηκε με προσθήκη 2 όγκων πιεζοχύμενης αιθανόλης 96%. Μετά από φυγοχέντρηση και ξήρανση του σφιγίου, το γραμμοποιημένο DNA διαλύθηκε εντός 50 μλτ. ύδατος και η συγκέντρωση υπολογίστηκε σε πηκτή αγαρδζής.

5 **Μεταλλαξιγένεση σε 3 στάδια PCR:**

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 4, η 3 στιδίων μεταλλαξιγένεση περιλαμβάνει τη χρήση τευτάρων εκκινητών:

Εκκινητής μεταλλαξιγένεσης: (=A): 5'-GTGCGCGAGGGATGTTGGAAATGTTAGG-3'

Βοηθός PCR 1 (=B): 5'-GGTCATCCAGTCAGTGAGACCCTCTACCTATTAAATCGGC-3'

Βοηθός PCR 2 (=C): 5'-CCATGGCTTTCACGGTGTCT-3'

10 Λάβη PCR (=D): 5'-GGTCATCCAGTCAGTGAGAC-3'

Τα 3 στάδια εκτελέστηκαν με το ακόλουθο ρυθμιστικό το οποίο περιέχει: 10 mM Tris-HCl, πεχά 8,3, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,001% ζελατίνη, 0,2 mM dATP, 0,2 mM dCTP, 0,2 mM dGTP, 0,2 mM TTP, 2,5 μονάδες πολυμεράσης Taq.

15 Στο στάδιο 1, προστέθηκαν 100 pMol εκκινητή A, 100 pMol εκκινητή B και 1 fMol γραμμοποιημένου πλασμιδίου σε ένα σύνολο από 100 μλτ. μάγματος αντίδρασης και εφαρμόστηκαν 15 κύκλοι των 2 λεπτών στους 95°C, των 2 λεπτών στους 37°C και των 3 λεπτών στους 72°C.

Η συγκέντρωση του προϊόντος PCR εκτιμήθηκε σε πηκτή αγαρδζής. Ακολούθως, εκτελέστηκε το στάδιο 2. Περιελήφθηκαν 0,6 pMol προϊόντος του σταδίου 1 και 1 fMol γραμμοποιημένου πλασμιδίου σε ένα σύνολο από 100 μλτ. του ανωτέρω αναφερθέντος ρυθμιστικού και εφαρμόστηκε 1 κύκλος από 5 λεπτά στους 95°C, 2 λεπτά στους 37°C και 10 λεπτά στους 72°C.

20 Στο μήγιμα αντίδρασης του σταδίου 2, προστέθηκαν 100 pMol εκκινητή C και 100 pMol εκκινητή D (καθένα 1 μλτ.) και εφαρμόστηκαν 20 κύκλοι των 2 λεπτών στους 95°C, των 2 λεπτών στους 37°C και των 3 λεπτών στους 72°C. Αυτός ο χειρισμός περιελάμβανε το στάδιο 3 στη διαδικασία της μεταλλαξιγένεσης.

25 **Απομόνωση του μεταλλαγμένου θραύσματος περιορισμού:**

Το προϊόν από το στάδιο 3 απομονώθηκε από πηκτή αγαρδζής και διαλύθηκε ξανά σε 20 μ.λτ. ύδατος. Ακολούθως, χωνεύτηκε με το περιοριστικό ένζυμο BspMII σε συνολικό όγκο 50 μ.λτ. με την ακόλουθη σύνθεση: 100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, πεχά 7,9, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT και 10 μονάδες BspMII. Εκτελέστηκε επώαση στους 37°C επί 2 ώρες. Το θραύσμα 264 bp BspMII απομονώθηκε από μια πηκτή αγαρδζής.

30 **Σύνδεση στο φορέα έκφρασης pAHL:**

Το πλασμίδιο έκφρασης pAHL διασχίστηκε με BspMII υπό τις ανωτέρω συνθήκες και απομονώθηκε το μεγάλο θραύσμα από μια πηκτή αγαρδζής. Το απομονωμένο μεταλλαγμένο θραύσμα ως ανωτέρω συνδέθηκε με αυτόν το φορέα, και το μήγιμα σύνδεσης χρησιμοποιήθηκε προς μεταμόρφωση της E. coli. Η παρουσία και ο πρυσανατολισμός του θραύσματος επιβεβαιώθηκε μέσω διάσχισης ενός παρασκευάσματος πλασμιδίου από ένα τύπω μεταμόρφωσης με περιοριστικά ένζυμα. Η ανάλυση αλληλουχίας εκτελέστηκε στο δίκλωνο πλασμίδιο με τη χρήση της μεθόδου τερματισμού της διδεούσης αλυσίδας που ανέπτυξε ο Sanger. Το πλασμίδιο συνομιάστηκε pAHL254N και είναι απαράλλακτο με το pAHL, εκτός από το αλλαγμένο κωδικόνιο.

40 **Παράδειγμα 4: Κατασκευή των πλασμιδίων που εκφράζουν άλλες παραλλαγές της λιπάστης Humicola.**

Οι ακόλουθοι μεταλλαγμένοι τύποι κατασκευάστηκαν με την ίδια μέθοδο δύπως περιγράφηκε στο Παράδειγμα 3, εκτός από τη χρήση άλλων περιοριστικών ενζύμων για τη χώνευση του PCR-προϊόντος και ο φορέας χρησιμοποιήθηκε για την επανακλωνοποίηση του μεταλλαγμένου θραύσματος. Τα ονόματα των πλασμιδίων και εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για τις τριποποιήσεις έχουν ως κατωτέρω.

45

	Όνομα πλασμαδίου	Αλληλουχία εκπνιγή Α
	pAHLD254K	5'-GTGCGCAGGGATCTCGGAATGTT-3'
	pAHLD254R	5'-GTGCGCAGGGATTCTCGGAATGTT-3'
	pAHLD242N	5'-GCCGCCGGTGGCGTTGATGCCCTCTAT-3'
5	pAHLD242N/D254N	5'-GTGCGCAGGGATTTCGGAATGTTAGGCTGGTTATTGCCG- CCGGTGGCGTTGATGCCCTCTAT-3'
	pAHLE87R	5'-CCCGATCCAGTTCTTATCGATCGAGAGCCGG-3'
	pAHLE87K	5'-CGATCCAGTTCTTATCGATCGAGAGCCACGG-3'

10 **Παράδειγμα 5: Κατασκευή των παραλλαγών λιπάσης μέσω συνδυασμού των διαθέπιων μεταλλαγμένων τύ-
πων:**

15 Οι ακόλουθοι μεταλλαγμένοι τύποι κατασκευάστηκαν μέσω συνδυασμού των θραύσμάτων πλασμαδίου των με-
ταλλαγμένων τύπων που κατασκευάστηκαν ανωτέρω. Για πιοράδειγμα, ο pAHLE87K/D254K κατασκευάστηκε μέ-
σω απομόνωσης του τμήματος περιορισμού BamHI/BstXI από τον pAHLE87K και την εισαγωγή του θραύσματος
στον pAHLD254K που χωνεύτηκε με BamHI και BstXI:

	Πλινισμίδιο
	pAHLE87K/D254K
	pAHLE87Q/D254N/D242N/E210Q
	pAHLE87Q/D242N/E210Q
20	pAHLR209A/E210A/D96L
	pAHLR209A/E210Q/E56Q
	pAHLE210Q/D242N/D254N
	pAHLE87Q/E210Q//D242N

25 **Παράδειγμα 6:**

Μεταμόρφωση του *Aspergillus oryzae* (γενική διαδικασία)

30 Ενοφθαλμίστηκαν 100 χλστλ. YPD (Sherman et al., Methods in Yeasts Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory, 1981) με σπόρια από *A. oryzae* και επωάστηκαν με ανακίνηση επί περίπου 24 ώρες. Το μυκήλιο συλ-
λέχθηκε με διήθηση μέσω miracloth και ξεπλύθηκε με 200 χλστλ. 0,6 M MgSO₄. Το μυκήλιο αιωρήθηκε εντός 15
χλστλ. από 1,2 M MgSO₄, 10 mM NaH₂PO₄, πεχά = 5,8. Το αιώρημα ψύχθηκε σε πάγο και προστέθηκε 1 χλστλ.
ρυθμιστικού περιέχοντος 120 χλστγρ. από Novozym 234, φουρνιάς 1687. Μετά από 5 λεπτά, προστέθηκε 1 χλστλ.
από 12 χλστγρ./χλστλ. BSA (Sigma τύπος H25) και η επώαση συνεχίστηκε με ήπια αινάδευση επί 1,5-2,5 ώρες
στους 37°C ώσπου στο επιθεωρηθέν δείγμα στο μικροσκόπιο έγινε ορατός ένας μεγάλος αριθμός από πρωτοπλά-
στες.

35 Το αιώρημα διηθήθηκε μέσω miracloth, το διηθημα φέρθηκε σε αποστειρωμένο δοκιμαστικό σωλήνα και επι-
καλύφθηκε με 5 χλστλ. από 0,6 M σορβιτόλη, 100 mM Tris-HCl, πεχά = 7. Εκτελέστηκε φυγοκέντρηση επί 15 λε-
πτά σε 1.000 g και οι πρωτοπλάστες συλλέχθηκαν από την κορυφή του πρωτερεφαλού MgSO₄. Προστέθηκαν 2
40 δύκοι STC (1,2 M σορβιτόλη, 10 mM Tris-HCl, πεχά = 7,5, 10 mM CaCl₂) στο αιώρημα του πρωτοπλάστη και το
μίγμα φυγοκεντρήθηκε επί 5 λεπτά σε 1.000 g. Το σφαιρίο του πρωτοπλάστη επαναιωρήθηκε σε 3 χλστλ. STC και
επανασφαιρώντας στην επανασφαιρώντας. Επαναλήφθηκε αυτή η διαδικασία. Τελικώς, οι πρωτοπλάστες επαναιωρήθηκαν σε 0,2-1
χλστλ. STC.

45 Αναμίχθηκαν 100 μ.λτ. από το αιώρημα του πρωτοπλάστη με 5-25 μ.γρ. p3SR2 (ένα γονίδιο amdS A. nidulans
που φέρει το περιγραφόμενο πλασμαδίου υπό Hynes et al., Mol. and Cel. Biol., Vol. 3, No. 8, 1430-1439, Αύγουστος
1983) σε 10 μ.λτ. STC. Το μίγμα αφέθηκε στη θερμοκρασία δωματίου (Θ.Δ.) επί 25 λεπτά και προστέθηκαν και
αναμίχθηκαν προσεκτικά (δύο φορές) 0,2 χλστλ. από PEG 4000 60% (BDH 29576), 10 mM CaCl₂ και 10 mM Tris-
HCl, πεχά = 7,5 και τελικώς προστέθηκαν 0,85 χλστλ. του ίδιου διαλύματος και αναμίχθηκαν προσεκτικά. Το μίγ-
μα αφέθηκε στη Θ.Δ. επί 25 λεπτά, περιδινήθηκε σε 2.500 g επί 15 λεπτά και το σφαιρίο επαναιωρήθηκε σε 2

χλοτλ. αιοψίτολης 1.2 M. Μετά από μία ακόμα κατιεργήματη σε πλειοπλάντες αιτλανθηκαν σε ελαχιστες πλιέκες (Cove, Biochem. Biophys. Acta 113 (1966) 51-56) περιέχουσες 1 M σουκρόζης, πεχά = 7, 10 mM ακεταμίδιο ως πηγή αξότου και 20 mM CsCl προς αναστολή της ανάπτυξης υποβάθμου. Μετά από επώιση επί 4-7 ημέρες στους 37°C συλλέχθηκαν τα πρόδια, αιωρήθηκαν εντός στείρου ύδατος και ιστιλόθηκαν σε μονιμικές αποικίες. Αυτή η μέθοδος επαναλήφθηκε και τα πρόδια μιας μονιμικής αποικίας αποθηκεύθηκαν μετά τη δεύτερη επαναπομόνυμη ως ένας προσδιορισμένος μεταμυρφωμένος τύπος.

Παράδειγμα 7

Έκφραση της παραλλαγής λιπάσης D96L εντός Α. ογκας

Ο pAHLD96L μεταμορφώθηκε σε Α. ογκας IFO 4177 μέσω συν-μετιαμόρφωσης με p3SR2 περιέχοντα το γονίδιο amdS από τον Α. pīdūlans όπως περιγράφεται στο Παράδειγμα 15. Οι παρασκευισμένες ας αναπτέρω πρωτοπλάστες επωάστηκαν με ένα μίγμα από ίσες ποσότητες pAHLD96L και p3SR2, με τη χρήση περόπου 5 μ.γρ. από το καθένα. Επαναπομονώθηκαν δύο φορές 9 μεταμορφωμένοι τύποι οι οποίοι μπορούσαν να χρησιμοποιήσουν ακεταμίδιο ως μόνη πηγή αξότου. Μετά την ανάπτυξη σε YPD επί τρεις ημέρες, τα υπερχρέωντα καλλιέργειας μικρού θηκαν χρησιμοποιώντας τον προσδιορισμό της δραστικότητας λιπάσης δύος περιγράφεται στο Παράδειγμα 16 (Καθαρισμός των παραλλαγών λιπάσης της εφεύρεσης). Ο καλύτερος μεταμορφωμένος τύπος επιλέχθηκε για περαιτέρω μελέτες και αναπτύχθηκε επί 4 ημέρες στους 30°C σε μια φιάλη ανακίνησης 1 λι. σε μέσο 200 χλοτλ. FG4 (3% άλευρο σόγιας, 3% μαλτοδεξτρίνη, 1% πεπτόνη, το πεχά ρυθμίστηκε σε 7 με 4 M NaOH). Υπό αυτές τις συνθήκες ο μεταμορφωμένος τύπος απέδωσε περόπου 500 μονάδες λιπάσης ανά χλοτλ. καλλιέργειας.

Οι άλλες παραλλαγές λιπάσης παράχθηκαν χυρίως όπως περιγράφηκε ανωτέρω, με τη χρήση της γενικής διαδικασίας που περιγράφηκε στο Παράδειγμα 6.

Παράδειγμα 8

Καθαρισμός των παραλλαγών λιπάσης της εφεύρεσης

Προσδιορισμός της δραστικότητας λιπάσης:
Παρασκευάστηκε ένα υπόστρωμα για λιπάση μέσω γαλακτωματοποίησης τριβουτυρικής γλυκερίνης (MERCK) με τη χρήση αραβικού κόρμων ως γαλακτωματοποιητή.
Η δραστικότητα της λιπάσης προσδιορίστηκε σε πεχά 7 με τη χρήση της μεθόδου στατ. πεχά. Ορίστηκε μια μονάδα δραστικότητας λιπάσης (LU/χλοτλ.) ως η αναγκαία ποσότητα για την απελευθέρωση ενός μ.Μοι λιπαρού οξέος ανά λεπτό.

Στάδιο 1: Φυγοκεντρείται το υπερχρέωντο ζύμωσης, απορρύπτεται το ίζημα. Ρυθμίζεται το πεχά του υπερχρέων σε 7 και προστίθεται σταδιακά ίσιος όγκος ψυχρής αιθανόλης 96 %. Αφήνεται το μίγμα σε ηρεμία επί 30 λεπτά εντός παγολούτρου. Φυγοκεντρείται και απορρύπτεται το ίζημα.

Στάδιο 2: Ιοντοσταλακτική χρωματογραφία. Διηθείται το υπερχρέων και φέρεται σε στήλη ταχείας ροής DEAE (Pharmacia TM) ισορροπημένη με 50 mM τριες-οξεικό ρυθμιστικό πεχά 7. Ξεπλένεται η στήλη με το ίδιο ρυθμιστικό μέχρι η απορρόφηση στα 280 nM να είναι μικρότερη από 0,05 OD. Εκλούεται η δεσμευμένη ενζυμική δραστικότητα με γραμμική βαθμίδωση όλατος εντός του ίδιου ρυθμιστικού (0 έως 0,5 M NaCl) με τη χρήση διγκων πέντε στηλών. Συλλέγονται τα τιμήματα που περιέχουν την ενζυμική δραστικότητα.

Στάδιο 3: Υδρόφοβη χρωματογραφία. Ρυθμίζεται η γραμμοριστικότητα της δεξαμενής που περιέχει την ενζυμική δραστικότητα σε 0,8 M με προσθήκη στερεού οξεικού αμμωνίου. Φέρεται το ένζυμο σε στήλη πηκτής TSK Butyl-Tyopearl 650 C (διαθέσιμη από την Tosoh Corporation Japan) η οποία εξισορροπήθηκε προκαταρτικά με 0,8 M οξεικό αμμωνίο. Ξεπλένεται το μη συνδεθέν υλικό με 0,8 M οξεικό αμμωνίου και εκλούεται το δεσμευμένο υλικό με αποσταγμένο ύδωρ.

Στάδιο 4: Εκλούεται με ύδωρ η δεξαμενή που περιέχει τη δραστικότητα λιπάσης προς ρύθμιση της αγωγιμότητας σε 2 mS και πεχά σε 7. Φέρεται η δεξαμενή σε στήλη σεφαλόζης υψηλής απόδοσης O (Pharmacia) εξισορροπημένης προκαταρτικά με 50 mM τριες-οξεικό ρυθμιστικό πεχά 7. Εκλούεται το δεσμευμένο ένζυμο με γραμμική βαθμίδωση όλατος.

Παράδειγμα 9

Απόδοση στο πλύσιμο των παφαλλιγύν λιπάσης της εφεύρεσης

Η απόδοση στο πλύσιμο των παφαλλιγύν λιπάσης Humicola lanuginosa της εφεύρεσης εκτιμήθηκε με βάση τη δοσολογία ενζύμου σε χλοτγρ. πρωτεΐνης ανά λίτρο σύμφωνα με την OD₂₈₀ σε σύγκριση με τον άγχιο τύπο λιπάσης H. lanuginosa.

Εκτελέστηκαν δοκιμές πλυσίματος σε ποτήρια ζέσεως των 150 χλστλ. θερμοστατημένα εντός υδρολούτρου. Τα ποτήρια ζέσεως αναδεύτηκαν με τριγυνικές μαγνητικές ράβδους.

Οι πειραματικές συνθήκες ήταν ως κάτωθι:

Μέθοδος: 3 κύκλοι με ολονύκτια ξήρανση μεταξύ κάθε κύκλου

10 Υγρό πλυσίματος: 100 χλστλ. ανά ποτήρια ζέσεως

Υφασμάτινο παρενθέμα: 6 παρενθέματα (3,5 X 3,5 cm) ανά ποτήριο ζέσεως

Υφασμα: Βάμβακας 100%, Test Fabrics Style #400

Χρώση: Χρωματισμένο λαρδί με ερυθρό των Συνδάν (0,75 χλοτγρ. χρωστική/γρ. λαρδιού).

15 Εφαρμόστηκαν 6 μλτ. λαρδιού θερμανθέντος στους 70 °C στο κέντρο κάθε παρενθέματος. Μετά την εφαρμογή της χρώσης, τα παρενθέματα θερμάνθηκαν σε φούρνο στους 75 °C επί 30 λεπτά. Τα παρενθέματα ακολούθως αποθηκεύθηκαν ολονυκτίως στη Θ.Δ. πριν από το πρώτο ξέπλυμα.

Απορρυπαντικό: LAS (Nansa 1169/P, 30% a.m.) 1,17 γρ./λτ.

AEO (Dobanol 25-7) 0,15 γρ./λτ.

Τριφωσφορικό νάτριο 1,25 γρ./λτ.

20 Θεικό νάτριο 1 γρ./λτ.

Ανθρακινό νάτριο 0,45 γρ./λτ.

Πυριτικό νάτριο 0,15 γρ./λτ.

Πεχά 10,2

Συγκέντρωση λιπάσης: 0,075, 0,188, 0,375, 0,75, και 2,5 χλοτγρ. πρωτεΐνης λιπάσης ανά λίτρο

25 Χρόνος: 20 λεπτά

Θερμοκρασία: 30 °C

Πλύσιμο: 15 λεπτά σε τρεχούμενο πόσιμο νερό

Ξήρανση: ολονυκτίως στη Θ.Δ. (περίπου στους 20 °C, σχετ. υγρασία 30-50%)

30 Αξιολόγηση: μετά το 3ο πλύσιμο, μετρήθηκε ο βαθμός ανακλασμού στα 460 nm.

Αποτελέσματα

Οι καμπύλες δόσης-απόκρισης συγκρίθηκαν για τις παραλλαγές λιπάσης και της φυσικής λιπάσης H. lanuginosa. Οι καμπύλες δόσης-απόκρισης υπολογίστηκαν με πρυσσαρισμογή των δεδομένων μέτρησης στην ακόλουθη εξίσωση:

35

$$\Delta R = \Delta R_{μεγ.} \frac{C^{0.5}}{K + C^{0.5}} \quad (I)$$

40 δύον

το ΔR είναι το εκφραζόμενο αποτέλεσμα σε μονάδες ανακλαστικότητας

το C είναι η συγκέντρωση του ενζύμου (χλοτγρ/λτ.)

το $\Delta R_{μεγ.}$ είναι μια σταθερά που εκφράζει το μέγιστο αποτέλεσμα

το K είναι μια σταθερά το K^2 εκφράζει συγκέντρωση ενζύμου στην οποία λαμβάνεται το μεγίστου αποτελέσματος.

45

Υπολογίστηκαν οι πιθανότητες βελτίωσης, με βάση τις χαρακτηριστικές πιστεύεσ ΑR_{μεγ.} και Κ που βρέθηκαν για κάθε παραλλαγή λιπάσης διαστάσης και για τη λιπάση άγριου τύπου. Ο πιθανότητας βελτίωσης, ορίζεται ως εξής:

5

$$f_{\text{βελτίωσης}} = C_{\text{WT}} / C \quad (\text{II})$$

εκφράζει την ποσότητα πρωτείνης της παραλλαγής λιπάσης που χρειάζεται για τη λήψη του ίδιου αποτελέσματος διαστάσης αυτό ελήφθη με 0,25 χλωτγρ.λτ. με αναφορά στην πρωτείνη άγριου τύπου (C_{WT}).

Έτσι, η διαδικασία για τον υπολογισμό των πιθανότητας βελτίωσης είναι ως ακολούθως:

10

1) Το αποτέλεσμα της πρωτείνης άγριου τύπου στα 0,25 χλωτγρ.λτ. (ΔR_{άγριος πίπος}) υπολογίστηκε με τη βοήθεια της εξίσωσης (I):

2) Η συγκέντρωση της παραλλαγής λιπάσης που προκύπτει από το ίδιο αποτέλεσμα διαστάσης αυτή του άγριου τύπου στα 0,25 χλωτγρ.λτ. υπολογίστηκε με τη βοήθεια της εικόλου ήχης εξίσωσης:

15

$$C = \left(K_{(\text{παραλλαγή})} \frac{\Delta R_{\text{άγριος πίπος}}{\Delta R_{\text{μεγ. παραλλαγή}} - \Delta R_{(\text{άγριος πίπος})}} \right)_2 \quad (\text{III})$$

3) Ο πιθανότητας βελτίωσης υπολογίστηκε με τη βοήθεια της εξίσωσης (II).

20

Τα αποτελέσματα απεικονίζονται στον ακόλουθο Πίνακα I

Πίνακας I

25

30

35

Παραλλαγή

Πιθανότητας βελτίωσης

D96L	4,4
D111L	1
E87A	1
E56A	1,6
E56Q	2,6
R209A	1,1
D242N	1,7
R209A + E210A	1,9
R209A + E210A + D96L	2,8
E210Q + D242N + D254N	1,8
R209A + E210A + D96L + E56Q	1,5

40

Από τον Πίνακα 1 φαίνεται ότι οι παραλλαγές λιπάσης R209A + E210A, E56Q και D96L έχουν μια σημαντικά καλύτερη απόδοση πλυσίματος από την λιπάση άγριου τύπου. Αυτό πιθανώς να αποδίδεται στο μειωμένο αρνητικό φορτίο και στην αυξημένη υδροφοβία αυτών των παραλλαγών που προκύπτει από την αυξημένη αποχρόνιση κατά τη διάρκεια του πλυσίματος και συνεπώς υψηλότερη δραστικότητα κατά τη διάρκεια της φάσης του στεγνύματος. Η απόδοση των παραλλαγών λιπάσης E87A, D111L και R209A είναι ίση με αυτή του ενός ή μερικών άγριου τύπου.

45

Παράδειγμα 10

Αυξημένη Θερμική ευστάθεια των παραλλαγών λιπάσιων

Η Θερμική ευστάθεια των επιλεγμένων παραλλαγών της λιπάσης *H. lanuginosa* έχει εξεταστεί με Διαφορική Θερμοδιμετρία Σάρωσης (DSC). Με τη χρήση αυτής της τεχνικής, η θερμοκρασία θερμικής μετουσίωσης, Td, καθορίζεται με θέρμανση ενδιάμεσης ενζύμου σε σταθερά προγραμματισμένο ρυθμό.

5

Πειράματα:

Για τις έρευνες χρησιμοποιήθηκε ο Θερμοδιμετρητής Διαφορικής Σάρωσης MC-2D από την MicroCal Inc. Παρασκευήτηκαν ρυθμιστικά διαλύματα 50 mM στις ακόλουθες τιμές πεχά: 4 (οξικό), 7 (TRIS-οξικό), 10 (γλυκίνη).

10

Η συγκέντρωση του ενζύμου κυμαινόταν από 0,6 έως 0,9 χλστγρ./χλστλ., και μια συνολική ποσότητα χρησιμοποιήθηκε από περίπου 1,2 χλστλ. για κάθε πείραμα. Όλα τα δείγματα θερμάνθηκαν από 5°C έως 95°C με ένα ρυθμό σάρφωσης 90°C/ώρα.

15

Αποτελέσματα:

Τα αποτελέσματα για τον άγριο τύπο και τους επιλεγμένους μεταλλγμένους τύπους απεικονίζονται στον ακόλουθο πίνακα.

20

Αρ.	Μετάλλαξη	πεχά 4		πεχά 7		πεχά 10		
		Td	dTd	Td	dTd _d	Td	dTd	
	WT	58,9	–	74,7	–	69,3	–	
1	F211A	60,2	+1,3	75,8	+1,1	70,3	+1	
2	T267R	59,4	+0,5	75,7	+1	70	+0,7	
3	D111N	58,3	-0,6	75,6	+0,9	69,9	+0,6	
25	4	F211L	57,8	-1,1	74,8	0,1	69,4	0,1

Σημείωση: το dTd υποδηλώνει την αλλαγή στη θερμική ευστάθεια ως αποτέλεσμα της μεταλλαγής.

Παράδειγμα 11

30

Σταθερότητα κατά την απόθήκευση των παραλλαγών λιπάσης *H. lanuginosa* εντός υγρού απορρυπαντικού Δοκιμάστηκαν μερικές παραλλαγές εντός πρόπτου υγρού απορρυπαντικού με την ακόλουθη σύνθεση:

35

		% w/w
Ανιοντικός	LAS	10
	AS	1
35	Σάπινας	14
Μη ιοντικός	ΑΕΟ	13
Διαλύτης	1,2-προπανοδιόλη	3
	Αιθανόλη	5
Ρυθμιστικό	ΤΕΑ	6
40	Σώμα	1
Μέσο εξουδετέρωσης	NaOH	2
Σταθεροποιητής κτ.λ.	SXS	1
	Ca ²⁺	0,0025
	φωσφονικά	0,4
45	Na ₂ SO ₄	0,2
Υδωρ	προστιθέμενο έως 100%	
Πεχά	8 ή 10	

Πρωτότυπης 1.000 LU/γρ. απορρυπαντικού και σε μερικά δείγματα προστεθήκαι 0,25 AU/γρ. (Alcalase[®]). Τα δείγματα αποθηκεύτηκαν σύμφωνα με το ακόλουθο σχήμα (το καινένα εις τριπλούν)

Θερμοκρατία αποθήκευσης:	-18°C	30°C
5 Απορρυπαντικό		
πεχά 8, χωρίς πρωτεάση	2 & 7 ημέρες	2 & 7 ημέρες
πεχά 8, 0,025 AU/γρ.		2 ημέρες
πεχά 10, χωρίς πρωτεάση	7 ημέρες	7 ημέρες

10 Εφαρμόζοντας αυτή την επώαση τα δείγματα αναλύθηκαν σύμφωνα με τη μέθοδο LU (Novo Nordisk AF 95,5). Υποθέτοντας ότι η διάσπαση της δραστικότητας λιπάσης ακολουθεί μια κινητική αντίδρασης πρώτης τάξης, η σταθερά της ταχύτητας διάσπασης μπορεί να προσδιοριστεί ως εξής:

$$A(t) = A_0 \cdot \exp(-k \cdot t)$$

15 το $A(t)$ είναι η δραστικότητα ενδύμου σε χρόνο t , το A_0 είναι η αρχική δραστικότητα και το k η σταθερά ταχύτητας αντίδρασης πρώτης τάξης.

Για το απορρυπαντικό που περιλαμβάνει πρωτεάση μπορεί να υπολογιστεί μια σταθερά ταχύτητας για την πρωτεόλυση από τη σχέση

20
$$A(t) = A_0 \cdot \exp(-[k + k_p] \cdot t)$$

όπου το k_p είναι η σταθερά ταχύτητας της πρωτεόλυσης, και όπου το k υπολογίζεται από τα δεδομένα σταθερότητας που προσδιορίστηκαν για το απορρυπαντικό χωρίς πρωτεάση.

25 Σε κάθε πείραμα, η λιπάση άγριου τύπου *H. lanuginosa* περιελήφθει ως αναφορά, και η σύγκριση των παραλλαγών με αυτές του άγριου τύπου έγινεν μόνο εντός του πειράματος για να μειωθεί η αφεβαιότητα της διακύμανσης ανάμεσα στα πειράματα.

Ακολούθως παρέχονται τα αυτοτελέσματα, και η σχετική βελτίωση μιας παραλλαγής έναντι του άγριου τύπου ως εξής:

30
$$IF_x = k_{W_t} / k_x$$

όπου το IF σημαίνει Παράγοντας βελτίωσης, το k_{W_t} είναι η σταθερά ταχύτητας διάσπασης του άγριου τύπου (σε δεδομένες συνθήκες) και το k_x είναι η αντίστοιχη σταθερά ταχύτητας της εξεταζόμενης παραλλαγής στο ίδιο πείραμα.

Το IF εκφράζει τη σχετική βελτίωση στο χρόνο ημέωρης (το $IF_x = 2$ υποδηλώνει ότι ο χρόνος ημέωρης της παραλλαγής x είναι διπλάσιος από αυτόν του άγριου τύπου στο ίδιο πείραμα).

Με βάση μια εκτίμηση των διακυμάνσεων των εντιγράφων σε ένα πείραμα το $IF < 0.7$ ή $IF > 1.3$ θεωρείται σημαντικό.

40 Η μονάδα του k_x είναι $(\text{ημέρα})^{-1}$.

Παραλλαγή	αρ. Πειράματος	πεχός χωρίς πρωτ. $k_p^* IF^*$	πεχός 8 + αλκαλίση		πεχός 10 χωρίς πρωτ. k_p IF	
			k_p	IF	k_p	IF
5	Άγριος τύπος	3	0,02	0,48	0,19	
		5	0,02	0,40	0,16	
		6	0,00	0,34	0,09	
		7	0,01	0,52	0,22	
	8	a	0,01	0,50	0,09	
10		b	0,01	0,52	0,07	
	D96N	3	0,00	0,21 2,3	0,15 1,3	
		5	0,02	0,26 1,6	n.d.	
15	D111N	3	0,00	0,50 1	0,16 1,2	
		5	0,02	0,31 1,3	0,13 1,2	
20	E56Q	3	0,01	0,22 2,2	0,14 1,4	
	D96L	6	0,01	0,17 2	0,08 1,2	
		7	0,00	0,23 2,3	0,09 2,6	
25	R209A/E210A/D96L	7	0,02	0,36 1,4	0,10 2,3	
	E210Q/D242N/D254N	7	0,02	0,49 1	n.d.	

Στο απορρυπαντικό σε πεχός 8 το k^* είναι σε όλες τις περιπτώσεις πολύ μικρό, και λόγω του σύντομου χρόνου αποθήκευσης (7 ημέρες, περίπου το 90% της παραμένουσας δραστικότητας) δεν προσδιορίζεται με μεγάλη ακρίβεια. Έτσι το IF δεν υπολογίζεται.

Συμπερασματικά ένας αφιμός των ελεγχθέντων παραλλαγών έχει βελτιωμένη αντοχή στην πρωτεολυτική αποδμηση, και σχεδόν όλες είχαν βελτιωμένη αντοχή σε αλκαλικές συνθήκες.

Παράδειγμα 12

Ειδική δραστικότητα
Για τις ακολούθιες δεικνυόμενες παραλλαγές λιπάσης μετρήθηκε μια μεγαλύτερη ειδική δραστικότητα (ποσότητες διασπώμενων μορίων υποστρώματος ανά μονάδα χρόνου ανά μονάδα πιστοποίησης) συγκριτικά με τον άγριο τύπο (wt). Αυτό σημαίνει ότι αυτές οι λιπάσες έχουν μια ανώτερη απόδυση υδρόλυσης του πραγματικού υποστρώματος.

Οι λιπάσες ζυμώθηκαν και καθαρισμένες λιπάσες ελέχθηκαν με ένα τυπικό προσδιορισμό LU (Αναλυτική μέθοδος, εσωτερικός αφιμός NOVO NORDISK AF 95/6-GB 1991,02.07). Το δείγμα αναλύθηκε δύο φορές, και οι μέσες τιμές καταχωρίζονται σε πίνακα. Η ποσότητα της πρωτεΐνης εκτιμήθηκε με μετρήσεις οπτικής πυκνότητας με φασματοφωτόμετρο Shimadzu, χρησιμοποιώντας μήκος κύματος 280 nm. Το δείγμα θεωρήθηκε καθαρό διαν η αναλογική τιμή του OD280 διαιρούμενη δια του OD260 ήταν μεγαλύτερη από 1,6, μαζί με μια μόνη ζώνη ηλεκτροφόρσης πηκτής SDS πολυακγυμδίσου.

	Humicola lanuginosa	Ειδική δραστικότητα LU/OD280
	D111N	4290*
	E56A	4890*
	L206V	4750
45	R209*/E210*	6686
	R209A/E210A/D96L	4818
	wt	3790

*δοκιμάστηκαν μόνο άταξ.

ΚΑΤΑΧΩΡΗΣΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ

(1) ΓΕΝΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ:

5 (i) ΚΑΤΑΧΩΡΗΤΗΣ: Novo Nordisk A/S
(ii) ΤΙΤΛΟΣ ΤΗΣ ΕΦΕΥΡΕΣΗΣ: Παραλλαγές λιπαίοης
(iii) ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ: 2
(iv) ΔΙΕΥΘΥΝΣΗ ΑΛΛΗΛΟΓΡΑΦΙΑΣ:
(A) ΠΑΡΑΛΗΠΤΗΣ: Novo Nordisk A/S
10 (B) ΟΔΟΣ: Novo Allé
(C) ΠΟΛΗ: Bagsværd
(E) ΧΩΡΑ: Δανία
(F) ΤΑΧ. ΚΩΔΙΚΑΣ: 2880

15 (v) ΑΝΑΓΝΩΣΙΜΗ ΜΟΡΦΗ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΗ:
(A) ΤΥΠΟΣ ΜΕΣΟΥ: Δισκέτα floppy
(B) ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΗΣ: IBM PC συμβατός
(C) ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ: PC-DOS/MS-DOS
20 (D) ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ: Patent In Release #1.0, Version #1.25

25 (vi) ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΤΡΕΧΟΥΣΑΣ ΚΑΤΑΘΕΣΗΣ:
(A) ΑΡΙΘΜΟΣ ΚΑΤΑΘΕΣΗΣ:
(B) ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΚΑΤΑΘΕΣΗΣ:
(C) ΚΑΤΗΓΟΡΙΑ:

30 (vii) ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΠΡΟΗΓΟΥΜΕΝΗΣ ΚΑΤΑΘΕΣΗΣ:
(A) ΑΡΙΘΜΟΣ ΚΑΤΑΘΕΣΗΣ: DK 2196/90
(B) ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΚΑΤΑΘΕΣΗΣ: 13 ΣΕΠ. 1990

35 (viii) ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΠΡΟΗΓΟΥΜΕΝΗΣ ΚΑΤΑΘΕΣΗΣ:
(A) ΑΡΙΘΜΟΣ ΚΑΤΑΘΕΣΗΣ: DK 2194/90
(B) ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΚΑΤΑΘΕΣΗΣ: 13 ΣΕΠ. 1990

40 (ix) ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΠΛΗΡΕΞΟΥΣΙΟΥ ΔΙΚΗΓΟΡΟΥ/ΠΡΑΚΤΟΡΑ
(A) ΟΝΟΜΑ: Thalsoe-Madsen, Birgit
(C) ΑΡΙΘΜΟΣ ΠΑΡΑΠΟΜΠΗΣ/ΣΥΝΟΨΗΣ: 3520,204-WO

45 (x) ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΤΗΛΕΠΙΚΟΙΝΩΝΙΑΣ:
(A) ΤΗΛΕΦΩΝΟ: +45 4444 8888
(B) TELEFAX: +45 4449 3256
(C) TELEX: 37304

290

(2) ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΚΟΛΟΥΘΙΑ SEQ ID NO: 2:

(i) ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ:

- (A) ΜΗΚΟΣ: 291 αμινοξέα
- (B) ΤΥΠΟΣ: αμινοξύ
- (D) ΤΟΠΟΛΟΓΙΑ: γραμμική

(ii) ΤΥΠΟΣ ΜΟΡΙΟΥ: πρωτεΐνη

(xi) ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ: SEQ ID NO: 2:

Met Arg Ser Ser Leu Val Leu Phe Phe Val Ser Ala Trp Thr Ala Leu
1 5 10 15

Ala Ser Pro Ile Arg Arg Glu Val Ser Gln Asp Leu Phe Asn Gln Phe
20 25 30

Asn Leu Phe Ala Gln Tyr Ser Ala Ala Tyr Cys Gly Lys Asn Asn
35 40 45

Asp Ala Pro Ala Gly Thr Asn Ile Thr Cys Thr Gly Asn Ala Cys Pro
50 55 60

Glu Val Glu Lys Ala Asp Ala Thr Phe Leu Tyr Ser Phe Glu Asp Ser
65 70 75 80

Gly Val Gly Asp Val Thr Gly Phe Leu Ala Leu Asp Asn Thr Asn Lys
85 90 95

Leu Ile Val Leu Ser Phe Arg Gly Ser Arg Ser Ile Glu Asn Trp Ile
100 105 110

Gly Asn Leu Asn Phe Asp Leu Lys Glu Ile Asn Asp Ile Cys Ser Gly
115 120 125

Cys Arg Gly His Asp Gly Phe Thr Ser Ser Trp Arg Ser Val Ala Asp
130 135 140

Thr Leu Arg Gln Lys Val Glu Asp Ala Val Arg Glu His Pro Asp Tyr
145 150 155 160

Arg Val Val Phe Thr Gly His Ser Leu Gly Gly Ala Leu Ala Thr Val
165 170 175

Ala Gly Ala Asp Leu Arg Gly Asn Gly Tyr Asp Ile Asp Val Phe Ser

180	185	190
Tyr Gly Ala Pro Arg Val Gly Asn Arg Ala Phe Ala Glu Phe Leu Thr		
195	200	205
Val Gln Thr Gly Gly Thr Leu Tyr Arg Ile Thr His Thr Asn Asp Ile		
210	215	220
Val Pro Arg Leu Pro Pro Arg Glu Phe Gly Tyr Ser His Ser Ser Pro		
225	230	240
Glu Tyr Trp Ile Lys Ser Gly Thr Leu Val Pro Val Thr Arg Asn Asp		
245	250	255
Ile Val Lys Ile Glu Gly Ile Asp Ala Thr Gly Gly Asn Asn Gln Pro		
260	265	270
Asn Ile Pro Asp Ile Pro Ala His Leu Trp Tyr Phe Gly Leu Ile Gly		
275	280	285
Thr Cys Leu		
290		

EP/15153

ΑΞΙΩΣΕΙΣ

5 1. Μια ενδυματικώς δραστική παραλλαγή λιπάσης από μια γονική λιπάση η οποία γονική λιπάση περιλαμβάνει μια καταλυτική τριάδα δίκην θρυψίνης περιλαμβάνουσα μια δραστική σερίνη κείμενη σε ένα κιτ' εξοχήν υδρόφορο, επιμήκη θύλακα σύνδεσης του μορίου της λιπάσης, και περιλαμβάνουσα μια επιφανειακή δομή βρόχου η οποία καλύπτει την ενεργή σερίνη όταν η λιπάση βρίσκεται σε ανενεργή μορφή, η οποία επιφανειακή δομή βρόχου μετατοπίζεται προς έκθεση των καταλοίπων ενεργών κέντρων όταν η λιπάση ενεργοποιείται μέσω αυτών δημιουργώντας μια λιπιδική ζώνη επαφής κείμενη στο τμήμα της δομής λιπάσης που περιέχει το ενεργό κατάλοιπο σερίνης που συνίσπεται από μια επιφάνεια με αυξημένο επιφανειακό υδρόφορο χαρακτήρι (υδροφορία) η οποία αλληλαντιδρά με το λιπιδικό υπόστρωμα στην ή κατά τη διάρκεια της υδρόλυσης, όπου το ηλεκτροστατικό φορτίο ή/και η υδροφορία της λιπιδικής ζώνης επαφής έχει μεταβληθεί μέσω εξάλειψης ή αντικατάστασης ενός ή περισσερων αρνητικά φορτισμένων κατάλοιπων αμινοξέων της λιπιδικής ζώνης επαφής μέσω συδέτερου ή θετικά φορτισμένου κατάλοιπου (-ων) αμινοξέων, ή/και μέσω της αντικατάστασης ενός ή περισσερων συδέτερων κατάλοιπων αμινοξέων με θετικό φορτισμένο κατάλοιπο (-α) αμινοξέων, ή/και με εξάλειψη ή αντικατάσταση ενός ή περισσερων υδρόφιλων καταλοίπων αμινοξέων με υδρόφορο κατάλοιπο (-α) αμινοξέων, υπό τον όρο ότι η ρηθείσα παραλλαγή λιπάσης είναι διαφορετική από τις παραλλαγές μιας τέτοιας γονικής λιπάσης αυτομονάστημη από τον *Pseudomonas putida* ATCC 53552, στην οποία το Cln στη θέση 127 έχει αντικατασταθεί με Arg ή/και το κατάλοιπο Phe στη θέση 207 έχει αντικατασταθεί με Thr, Gly, Lys ή Ala.

20 2. Μια παραλλαγή λιπάσης σύμφωνα με την αξίωση 1, όπου ένα ή περισσότερα κατάλοιπα γλουταμινικού οξέος ή ασπαρτικού οξέος της ρηθείσας λιπιδικής ζώνης επαφής έχουν αντικατασταθεί με γλουταμίνη, αισπαραγίνη, αλανίνη, λευκίνη, βαλινη, σερίνη, θρεονίνη, λυσίνη ή αργινίνη.

25 3. Μια παραλλαγή λιπάσης σύμφωνα με την αξίωση 1 ή 2, όπου η γονική λιπάση είναι μια μικροβιακή λιπάση.

30 4. Μια παραλλαγή λιπάσης σύμφωνα με την αξίωση 3, όπου η γονική λιπάση είναι μια μυκητιακή λιπάση, κατά προτίμηση εξαγόμενη από ένα στέλεχος του *Humicola* ή *Rhizomucor*.

35 5. Μια παραλλαγή λιπάσης σύμφωνα με την αξίωση 4, όπου η γονική λιπάση είναι μια λιπάση *Rhizomucor miehei*.

40 6. Μια παραλλαγή λιπάσης σύμφωνα με την αξίωση 5, όπου ένα ή περισσότερα κατάλοιπα αμινοξέα αντικαθίστανται ως ακολούθως:

D91N,K,R,A,V,L,S,T·
D256N,K,R,A,V,L,S,T·
D226N,K,R,A,V,L,S,T·
D61N,K,R,A,V,L,S,T·
D113N,K,R,A,V,L,S,T·
E201Q,K,R,A,V,L,S,T· ή
D243N,K,R,A,V,L,S,T.

45 7. Μια παραλλαγή λιπάσης σύμφωνα με την αξίωση 4, όπου η γονική λιπάση είναι μια λιπάση *Humicola lanuginosa*.

8. Μια παραλλαγή λιπασμάς σύμφωνα με την αξίωση 7, οπου έναι ή περισσότεραι κατέχουσται αμυνούσεαι αντικαθιστανται ως ακολουθως:

5 E87Q,K,R,A,N,T,S,L,V·
 D254N,K,R,A,Q,T,S,L,V·
 D242N,K,R,A,Q,T,S,L,V·
 E210Q,K,R,A,N,T,S,L,V·
 E56Q,K,R,A,N,T,S,L,V·
 D96N,K,R,A,Q,T,S,L,V·
10 D111N,K,R,A,Q,T,S,L,V·
 D62A,Q,N,T,S,K,R,L,V·
 E219A,Q,N,T,S,K,R,L,V·
 E234A,Q,N,T,S,K,R,L,V·
 E57A,Q,N,T,S,K,R,L,V·
15 E99A,Q,N,T,S,K,R,L,V·
 D27A,Q,N,T,S,K,R,L,V·
 E239A,Q,N,T,S,K,R,L,V·

20 T267K,R·
 S85K,R·
 T226K,R·
 N88K,R·
 N92K,R·
 I255K,R·
25 I202K,R·
 L206K,R·
 R209A·
 L259K,R·
 V203K,R· ή
30 L227K,R· ειδικότερα μια παραλλαγή λιπάσης περιλαμβάνουσα τις ακόλουθες αντικαταστάσεις:

 E87Q + D254N + D242N + E210Q·
 E87Q + D254N + E210Q·
 D96N + E87Q + D254N·
35 R209A + E210A·
 R209A + R210A + D96L· ή
 E210Q + D242N + D254N

40 9. Μια παραλλαγή λιπάσης σύμφωνα με την αξίωση 3, όπου η γονική λιπάση είναι μια λιπάση ξυμομύκητα. π.χ.
 εξαγόμενη από ένα στέλεχος *Candida*, ή μια βακτηριακή λιπάση. π.χ. εξαγόμενη από ένα στέλεχος *Pseudomonas*.

45 10. Μια δομή DNA περιλαμβάνουσα μια αλληλουχία DNA κωδικοποιούσσι μια παραλλαγή λιπίσης σύμφωνα
 με οποιαδήποτε των αξίωσεων 1-9.

 11. Ένας ανασυνδυασμένος φορέας έκφρασης ο οποίος φέρει μια δομή DNA σύμφωνα με την αξίωση 10.

12. Ένα κύτταρο το οποίο μεταμορφώνεται με μια δομή DNA σύμφωνα με την αξίωση 33 ή ένα φορέα σύμφωνα με την αξίωση 11.

13. Ένα κύτταρο σύμφωνα με τη αξίωση 12 το οποίο είναι ένα μυκητιακό κύτταρο, π.χ. ανήκον στο γένος *Aspergillus*, δηλαδή *A. niger*, *A. oryzae*, ή *A. nidulans*· ένα κύτταρο ζυμομύκητα, π.χ. ανήκον σε ένα στέλεχος *Saccharomyces*, όπως *S. cerevisiae*, ή ένα μεθυλοτροφικό ζυμομύκητα από το γένος *Hansenula*, δηλαδή *H. polymorpha*, ή *Phichia*, δηλαδή *P. pastoris*· ή ένα βακτηριακό κύτταρο, π.χ. που ανήκει σε ένα στέλεχος *Bacillus*, δηλαδή *B. subtilis*, ή *B. lentus*.

14. Ένα κύτταρο σύμφωνα με την αξίωση 12 το οποίο είναι ένα φυτικό κύτταρο, π.χ. που ανήκει στα *Solanaceae*, όπως *Solanum tuberosum*, ή *Nicotiana tabacum*.

15. Μια μέθοδος παραγωγής μιας παραλλαγής λιπάστης σύμφωνα με οποιαδήποτε τινα αξιώσειν 1-9, όπου ένα κύτταρο σύμφωνα με οποιαδήποτε των αξιώσεων 12-14 καλλιεργείται ή ανιαπτύσσεται υπό συνθήκες παραγωγής στην παραγωγή της παραλλαγής λιπάστης, και επομένως η παραλλαγή λιπάστης ανακτάται από την καλλιέργεια ή τη φυτό.

16. Ένα απορρυπαντικό πρόσθετο περιέχον μια παραλλαγή λιπάστης σύμφωνα με οποιαδήποτε από τις αξιώσεις 1-9, κατ' επιλογήν με τη μορφή μη κονιώδους κόκκου, σταθεροποιημένου υγρού ή προστατευμένου ενζύμου.

17. Ένα απορρυπαντικό πρόσθετο σύμφωνα με την αξίωση 16 το οποίο περιλαμβάνει 0.02-200 χλωτγρ. ενζυμής πρωτεΐνης/γρ. του πρόσθετου.

18. Ένα απορρυπαντικό πρόσθετο σύμφωνα με την αξίωση 16 ή 17 το οποίο επιπροσθέτως περιέχει ένα άλλο ενζυμο δηλαδή μια πρωτεΐνη, αμυλάση, υπεροξειδάση ή/και κυτταφινάση.

19. Μια απορρυπαντική σύνθετη περιέχουσα μια παραλλαγή λιπάστης σύμφωνα με οποιαδήποτε των αξιώσεων 1-9.

20. Μια απορρυπαντική σύνθετη σύμφωνα με την αξίωση 19 η οποία επιπροσθέτως περιέχει ένα άλλο ενζυμο δηλαδή μια πρωτεΐνη, αμυλάση, υπεροξειδάση ή/και κυτταφινάση.

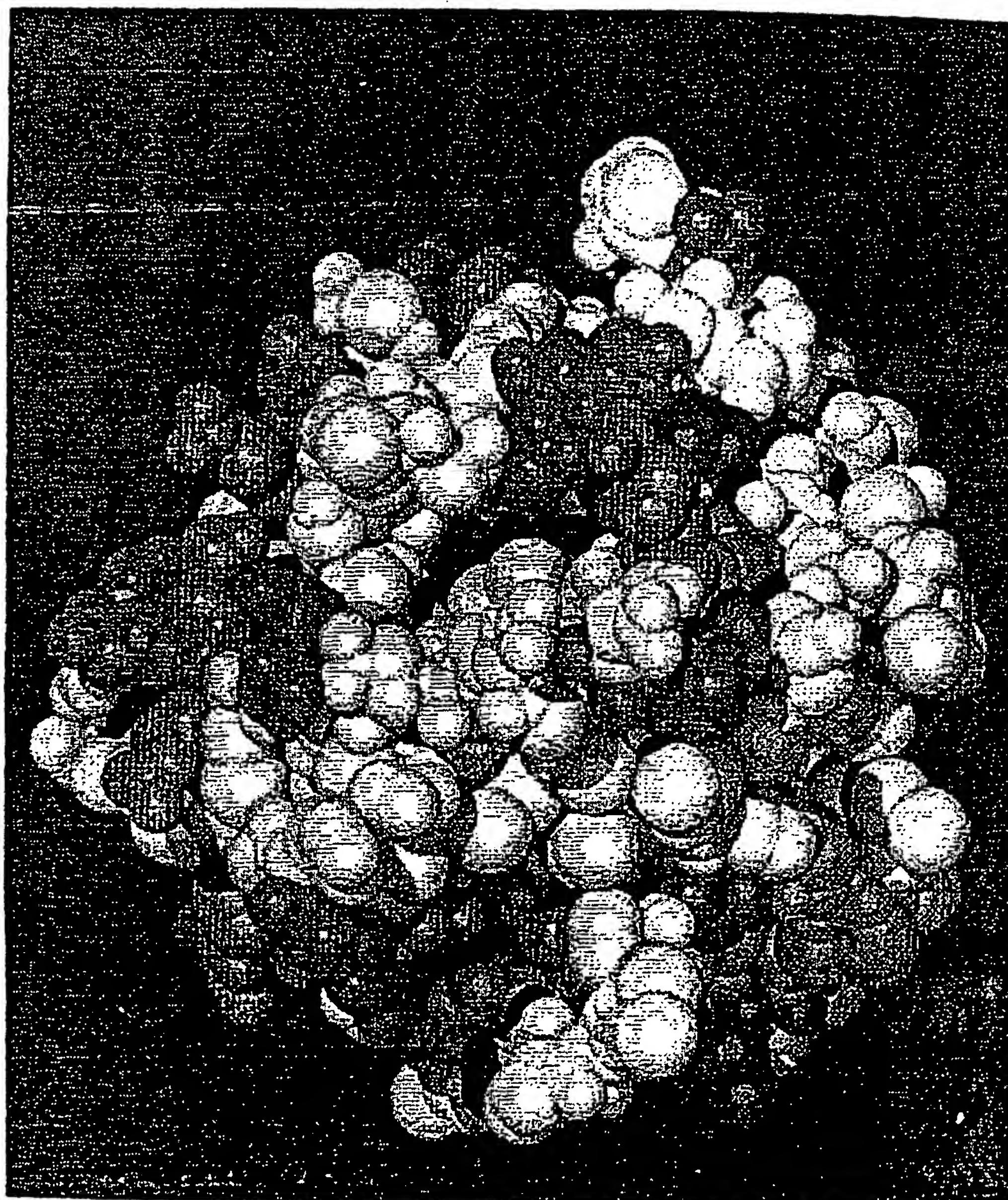
ΤΙΤΛΟΣ

Παραλλαγές λιπάσης

Περιληψη

Οι λιπάσες που περιέχουν μια δίκην θρυψίνης καταλυτική τριάδα περιλαμβάνουσα μα ενεργή σερίνη κείμενη σε ένα και' εξοχήν υδρόφορο, επιμήκη θύλαικα πύνδεσης του μορίου της λιπάσης, ο οποίος θύλαικας αποτελεί μέρος της και περιβάλλεται από μια λιπιδική ζώνη επαφής, μεταλλάσσονται μέσω εξάλειψης ή αντικατάστασης ενός ή περισσότερων καταλοίπων αμινοξέων στη λιπιδική ζώνη επαφής έτσι ώστε να μεταβάλλεται το ηλεκτροστατικό φορτίο ή/και ο υδρόφορος χαρακτήρας της λιπιδικής ζώνης επαφής, ή έτσι ώστε να μεταβάλλεται η επιφανειακή συμμορφία της λιπιδικής ζώνης επαφής της λιπάσης.

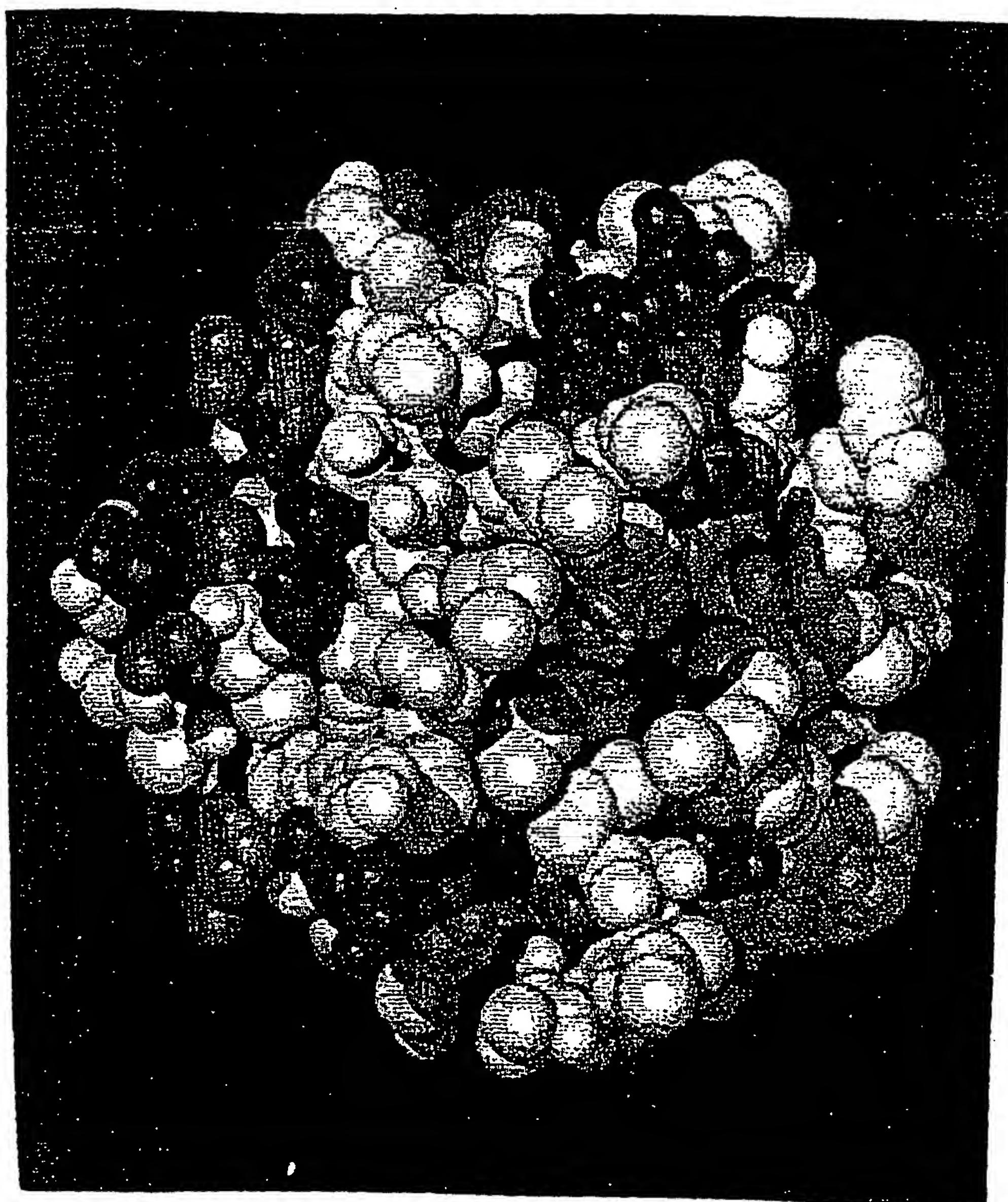
1/9



Ex. 1a

NZAS-0026820

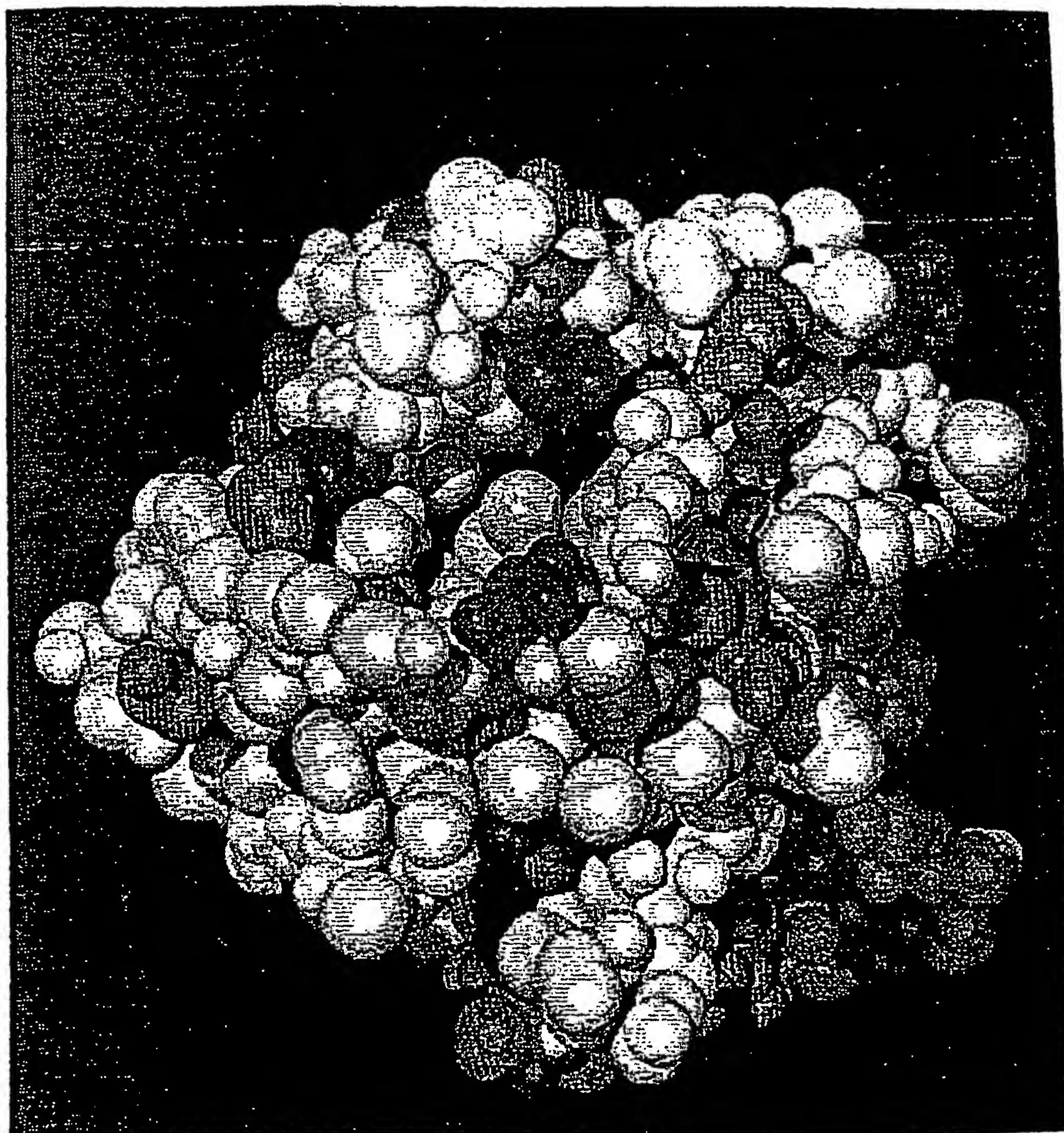
2/9



Ex. 1B

NZAS-0026821

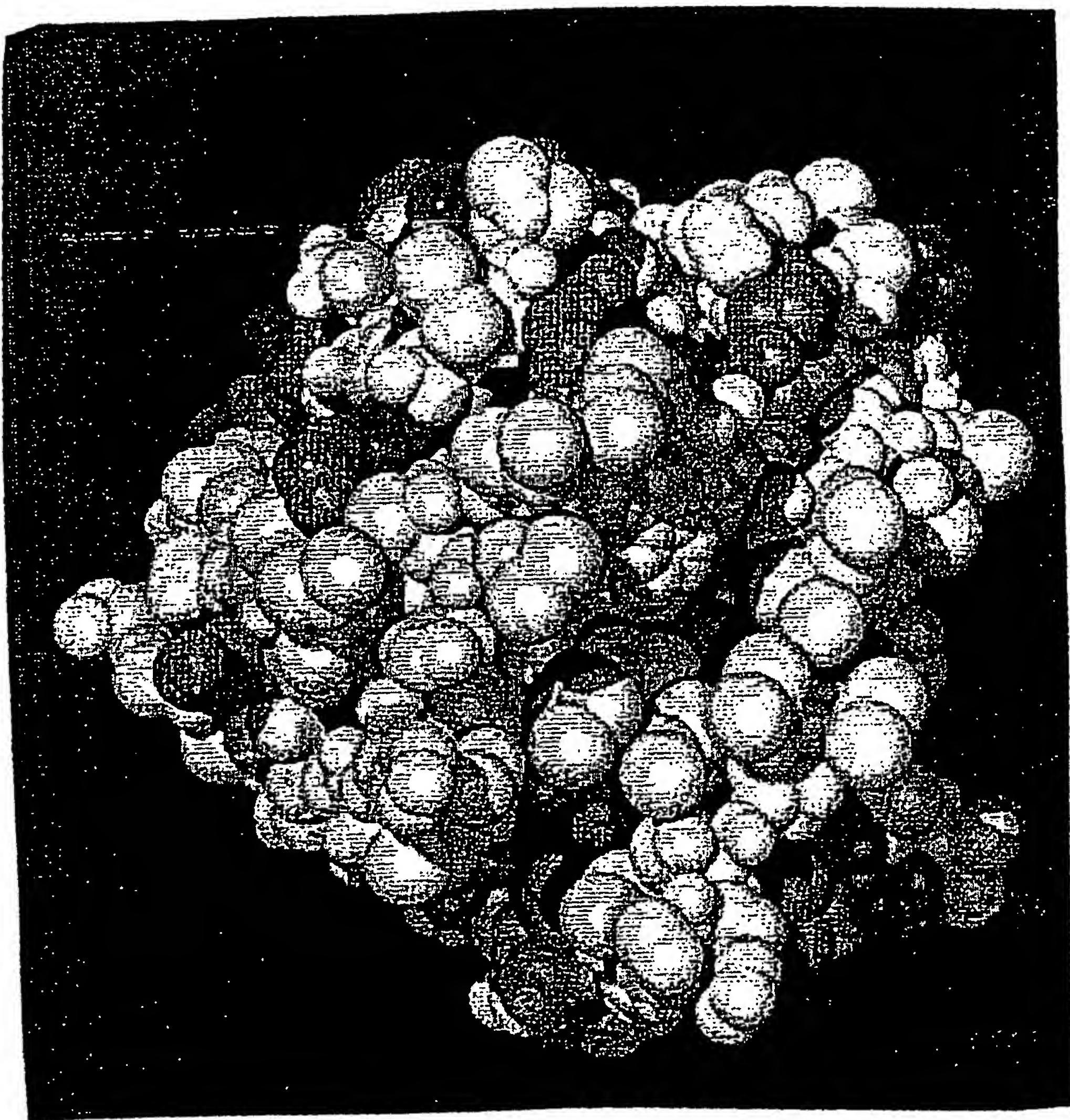
3/9



Ex. 2a

NZAS-0026822

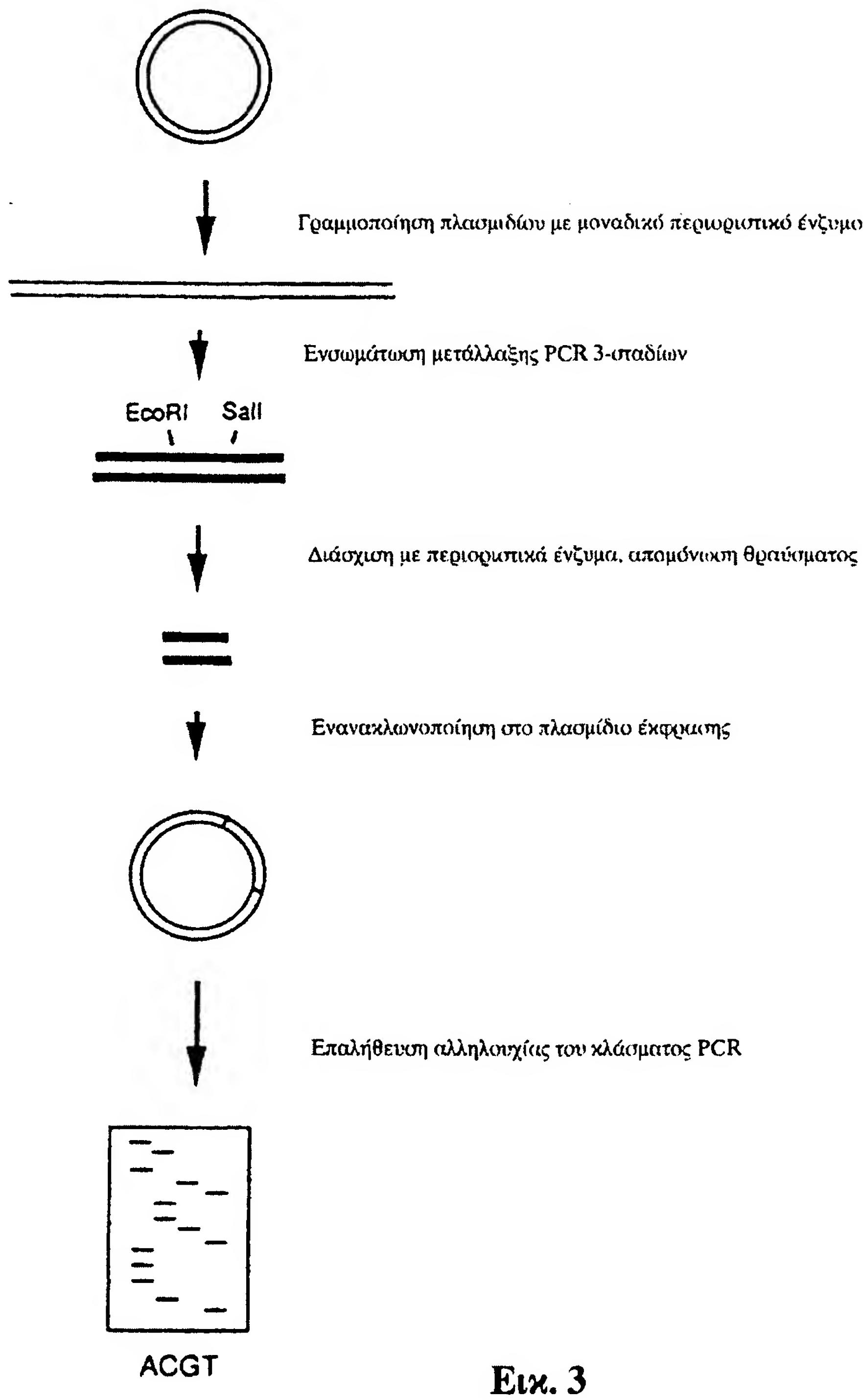
4/9

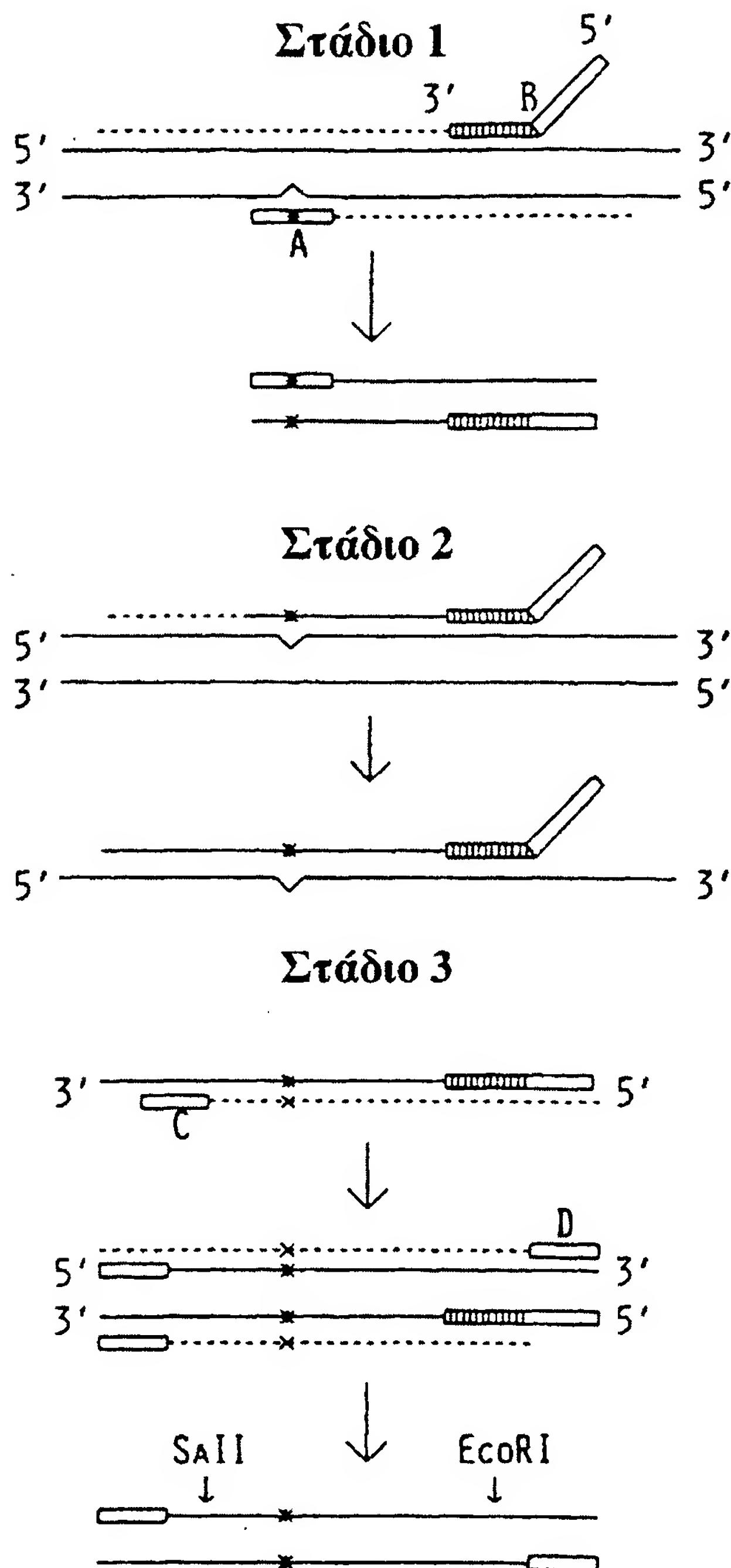


Ex. 2β

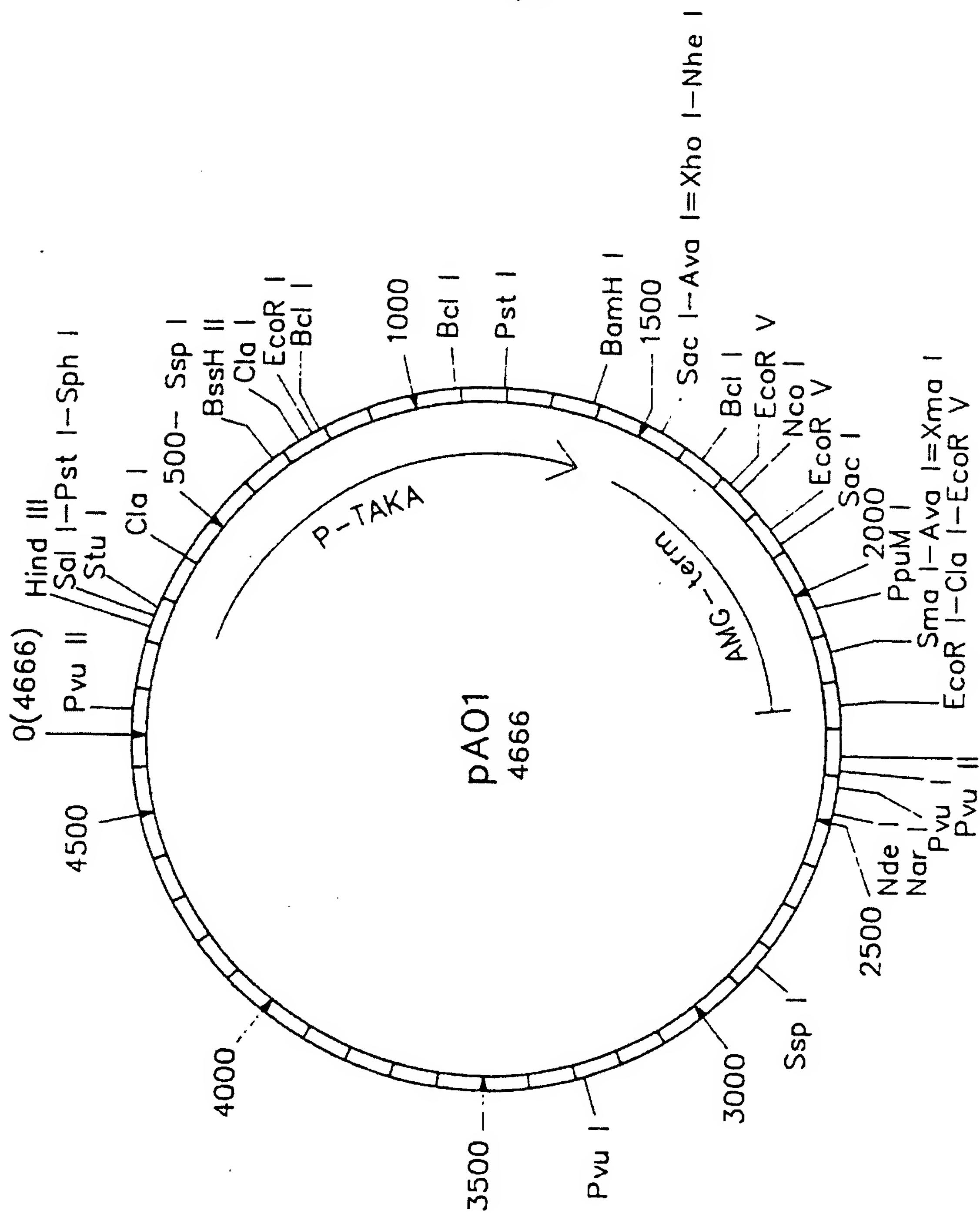
NZAS-0026823

5/9



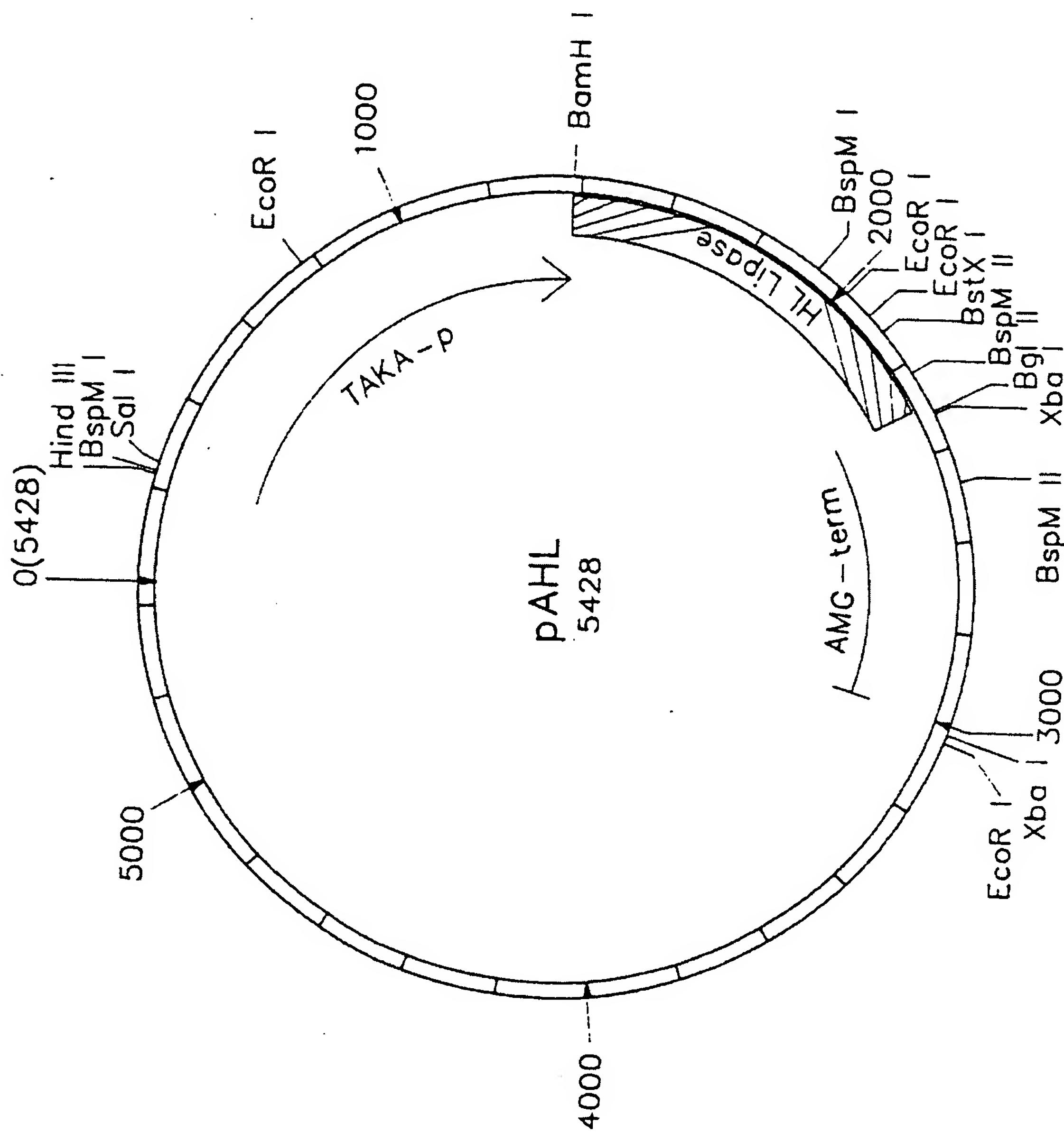


Εικ. 4



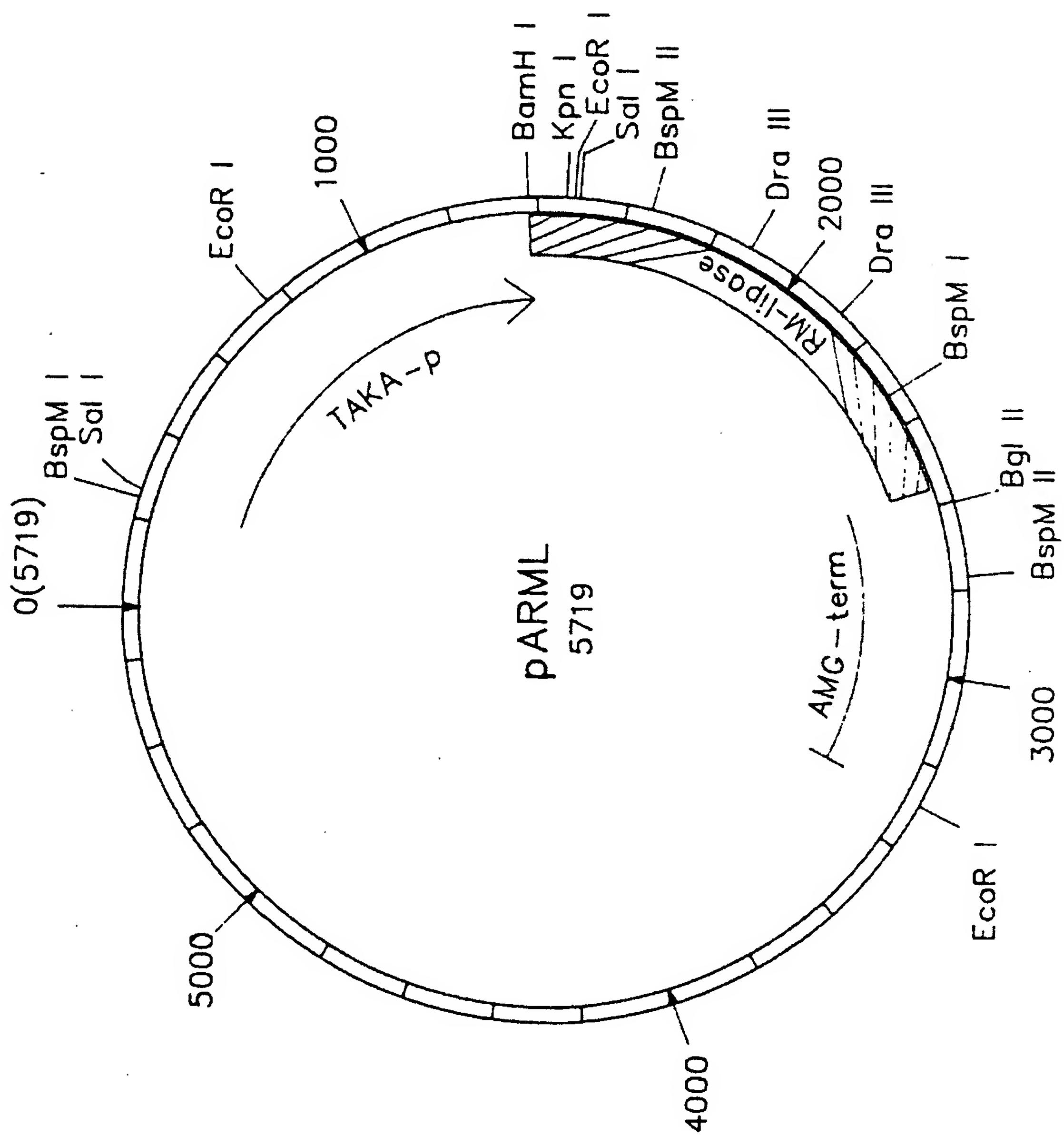
Ex. 5

8/9



Ex. 6

9/9



Ex. 7